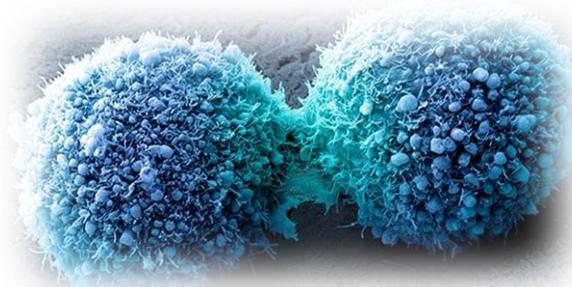


TRABAJO FIN DE GRADO – CURSO ACADÉMICO 2017/2018

**“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE  
EXTRACTOS MARINOS EN MODELOS DE CÁNCER DE  
COLON CON DIFERENTE NIVEL DE EXPRESIÓN DE RAS”**



**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA - FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. DEPARTAMENTO DE  
INGENIERÍA

AUTOR

**ERIK RAMÓN GIL**

TUTOR

**ENRIQUE BARRAJÓN CATALÁN**

COTUTORES

**VERÓNICA RUIZ TORRES**

**MARÍA DOLORES HERRANZ LÓPEZ**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN y PALABRAS CLAVE (ABSTRACT and KEY WORDS)</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Anatomía del Colon</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Biología del Cáncer</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Estadísticas poblacionales del Cáncer</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. El Cáncer de Colon y clasificación TNM</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5. La importancia de la proteína Ras en el Cáncer de Colon</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6. Compuestos Naturales Bioactivos de origen Marino con Capacidad Antitumoral</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Líneas Celulares y Mantenimiento</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. Caracterización Molecular de los Extractos mediante HPLC-ESI-QTOF-MS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3. Ensayo de Citotoxicidad mediante MTT</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4. Ensayo Western Blot de Expresión de Proteínas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5. Análisis Estadístico ANOVA two-way</b> .....	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1. Caracterización Molecular de los Extractos mediante HPLC-ESI-QTOF-MS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. Ensayo de Viabilidad Celular</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3. Ensayo de Expresión de la proteína K-Ras</b> .....	<b>26</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA</b> .....	<b>36</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>38</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>

## **RESUMEN**

Los organismos marinos son una fuente casi inexplorada de nuevos compuestos con actividad farmacológica. Algunos de estos compuestos poseen actividad antiproliferativa y pueden ser empleados como posibles fármacos antitumorales. En el presente trabajo, se han utilizado extractos de tres organismos marinos (un coral, una holoturia y un nudibranchio) y probado su actividad antiproliferativa en una batería de 5 líneas celulares de cáncer de colon con diferente perfil de expresión de la proteína K-Ras. De las 5 líneas celulares, 3 presentan una versión mutada de K-Ras (SW480, SW620 y HCT116) y 2 presentan una versión silvestre de tal proteína (HGUE-C-1 y HT-29).

La actividad antiproliferativa se analizó para los tres extractos en las 5 líneas mediante el ensayo MTT y se comprobó la influencia de los extractos sobre la expresión de K-Ras mediante Western Blot en dos líneas representativas (una mutante de K-Ras y otra silvestre para K-Ras).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el extracto que presenta una mayor capacidad antiproliferativa es el PS (procedente de holoturia), seguido del extracto NB (nudibranchio) y del extracto CR (coral). Asimismo, los niveles de expresión de Ras se alteran cuando las células son tratadas con tales extractos marinos.

**PALABRAS CLAVE:** Ras, extractos marinos, cáncer.

## **ABSTRACT**

Marine organisms are an unexplored source of new compounds with pharmacological activity. Some of them possess antiproliferative activity against cancer cells and they can be used as antitumor drugs. In this project, we have used marine extracts derived from three marine organisms (coral, holoturia and nudibranch) and we have tested their antiproliferative activity on a collection of 5 colon cancer cell lines with different K-Ras expression profile. Three of the five colon cancer cell lines have a mutated version of the K-Ras protein (SW480, SW620 and HCT116), and the remaining two are wild-type for that protein (HGUE-C-1 and HT-29).

The antiproliferative activity was analysed for the three extracts in each of the 5 cell lines by using the MTT assay, and the influence of the extracts on the K-Ras expression was also tested by using the Western Blot assay in two representative cell lines (one K-Ras mutant, and other wild-type for K-Ras).

The results show that the PS (holoturia) extract exhibited the most powerful antiproliferative capacity is, followed by NB (nudibranch) and CR (coral). In addition, Ras expression levels were altered in the two cell lines tested when the cells were treated with these extracts.

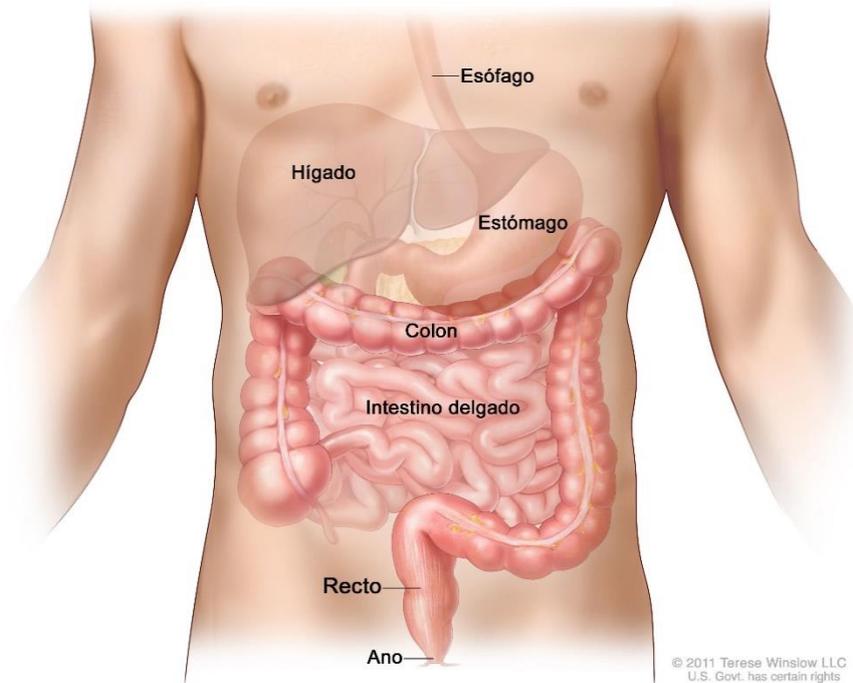
**KEY WORDS:** Ras, marine extracts, cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Anatomía del Colon

El colon es la última región del tubo digestivo, y posee una longitud aproximada de unos 1,5 metros. Además, constituye la mayor parte del intestino grueso, pues comienza en la porción del ciego (en la cual desemboca el intestino delgado) y se extiende hasta llegar al recto. Así, en mamíferos consta de varias secciones tales como: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y sigma (o colon sigmoideo).

La función principal del colon ascendente y el colon transverso es la de absorber agua e iones tales como sodio y potasio. Mientras que la del colon descendente y el colon sigmoideo es la de almacén de materia fecal hasta su expulsión a través del ano.



**Figura 1.-** Anatomía del Colon. Fuente: Terese Winslow LLC (2011)

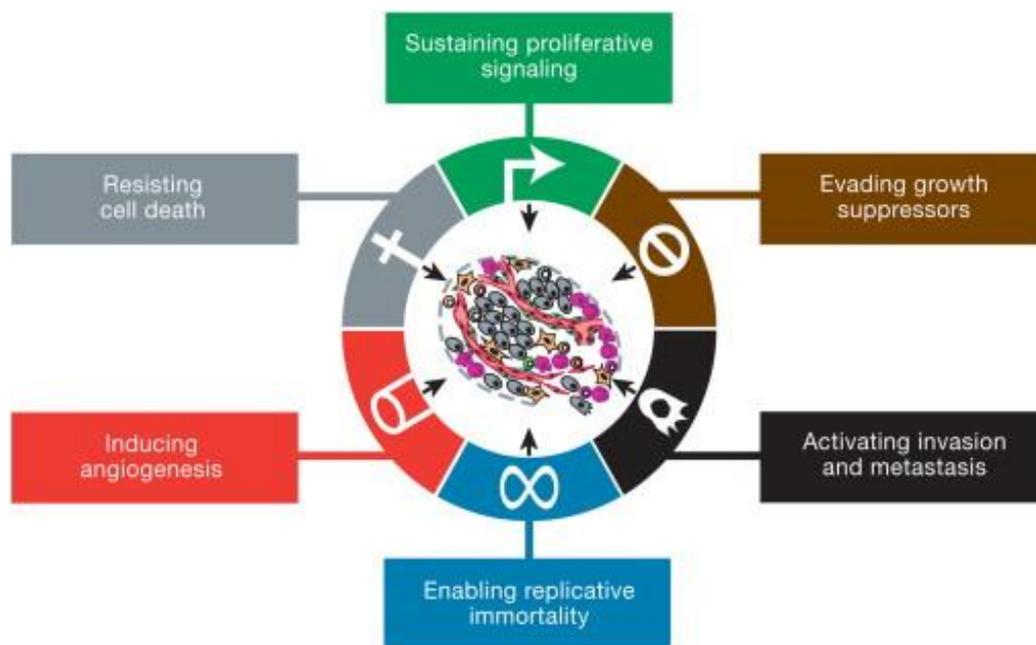
### 1.2. Biología del Cáncer

El cáncer es el conjunto de enfermedades causadas por la multiplicación incontrolada de células anormales. Estas células son capaces de invadir a tejidos cercanos, o bien diseminarse hasta partes del cuerpo más alejadas a través del sistema vascular o del sistema linfático.

Los distintos tipos de cáncer se clasifican en:

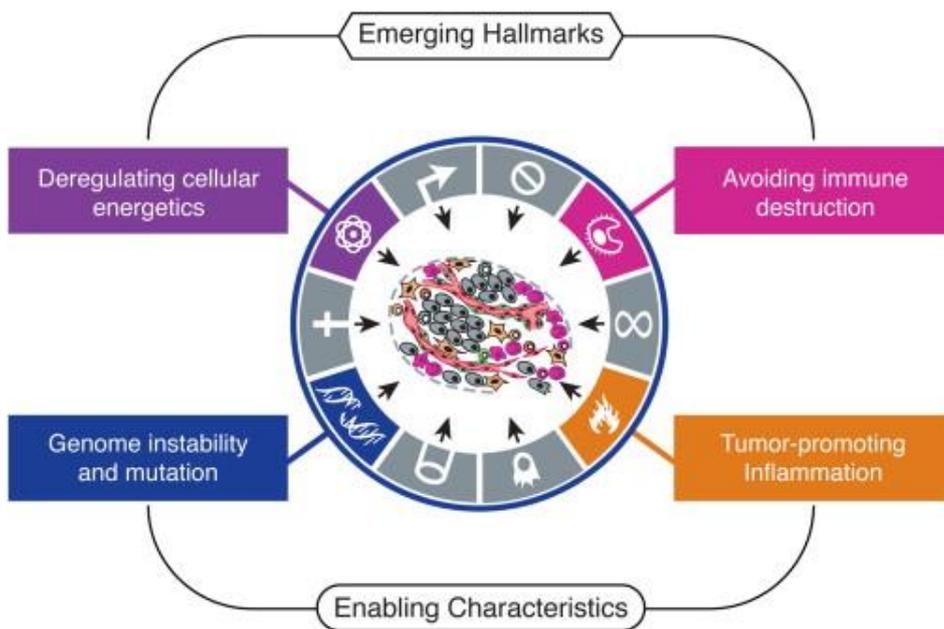
- **Carcinoma:** cáncer que comienza en la piel o en tejidos de recubrimiento de órganos internos.
- **Sarcoma:** cáncer que comienza en un tejido conjuntivo (hueso, cartílago, músculo, etc.) o de sostén.
- **Leucemia:** cáncer que se origina en la médula ósea, la cual es responsable de producir células sanguíneas.
- **Linfoma y Mieloma múltiple:** cáncer originado en células del sistema inmune.
- **Cánceres del Sistema Nervioso Central:** comienzan en tejidos cerebrales o en la médula espinal.

El cáncer se compone de diversos sellos distintivos, los cuales son: el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores del crecimiento, la activación de la invasión y la metástasis, la inmortalidad replicativa, la resistencia a la muerte celular y, finalmente, la inducción de la angiogénesis (Figura 2).



**Figura 2.-** Sellos distintivos de las células tumorales. Fuente: Hanahan (2011)

Subyacente a los sellos distintivos anteriores, encontramos la inestabilidad genómica y la inflamación. Y, además, se han añadido dos características tumorales emergentes (Figura 3): la desregulación energética celular (la cual, consiste en modificar el metabolismo celular para dar mayor soporte a la proliferación neoplásica) y la evasión de la destrucción del sistema inmune (adquiriendo así resistencia frente a los linfocitos T y B, a los linfocitos *Natural Killer* y a los macrófagos) [1].



**Figura 3.-** Nuevos sellos distintivos de las células tumorales. Fuente: Hanahan (2011)

### 1.3. Estadísticas poblacionales del Cáncer

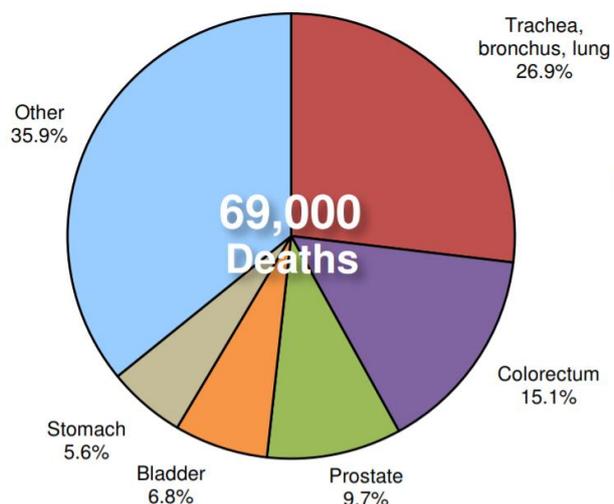
El cáncer es la segunda causa de muerte en Europa y Estados Unidos, después de las enfermedades cardiovasculares.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (*“World Health Organization”*, WHO por sus siglas en inglés) de 2014, de las 398.000 muertes totales que se dieron en España el año 2014, 69.000 fueron debidas a cánceres que padecían hombres, y 42.600 a cánceres que padecían mujeres. Así mismo, de esas 69.000 muertes de hombres, el 15,1% corresponde a cáncer colorrectal. Y de las 42.600 muertes de mujeres, el 17,1% corresponde a cáncer colorrectal (Figuras 4A y 4B). Por lo que se puede deducir que el cáncer colorrectal produce un número de muertes ligeramente superior en mujeres que en hombres.

Además, el cáncer colorrectal se encuentra en tercera posición en incidencia en los hombres, mientras que lo hace en segunda posición en las mujeres (Figuras 4C y 4D) [2].

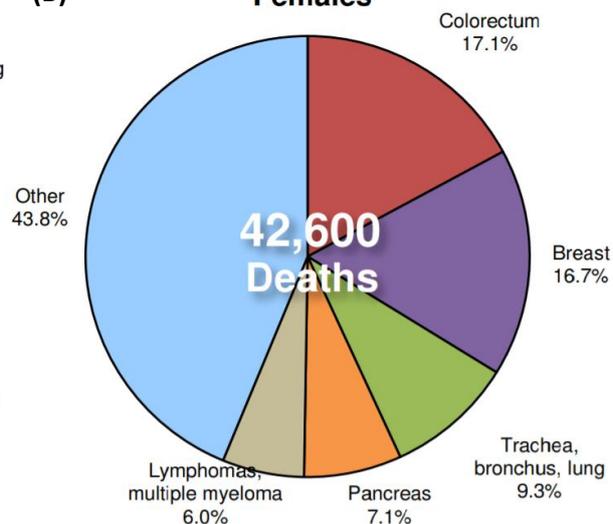
(A)

**Males**



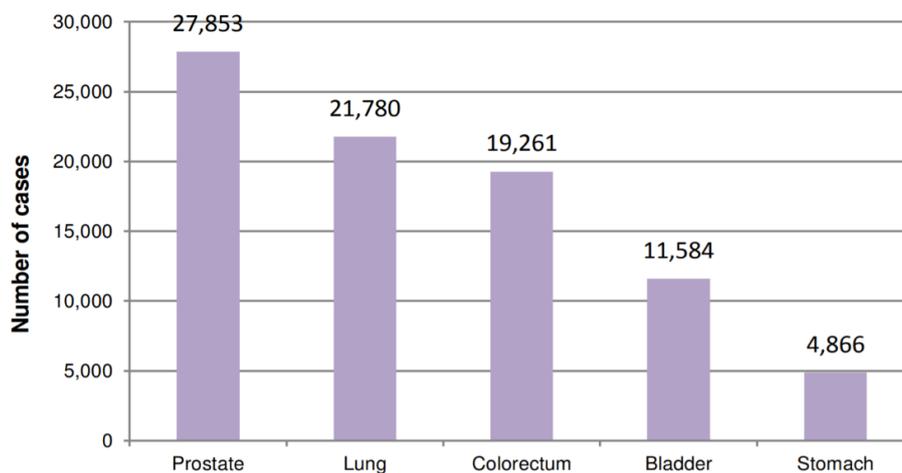
(B)

**Females**



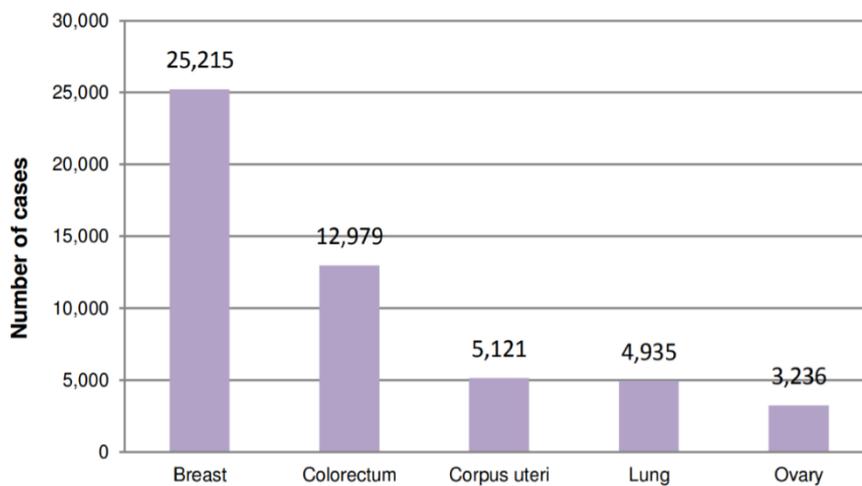
(C)

**Males**



(D)

**Females**



**Figura 4.-** Incidencia de diversos tipos de cáncer en España. **(A)** Muertes producidas por los distintos tipos de cáncer en España para el sexo masculino. **(B)** Muertes producidas por los distintos tipos de cáncer en España para el sexo femenino. **(C)** Incidencia de los distintos tipos de cáncer en España para el sexo masculino. **(D)** Incidencia de los distintos tipos de cáncer en España para el sexo femenino. Fuente: WHO – Cancer Country Profiles (2014).

#### 1.4. El Cáncer de Colon y Clasificación TNM

La mayoría de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas (cánceres que comienzan en las células que producen y liberan moco y otros líquidos). El cáncer colorrectal comienza a menudo como un crecimiento que se llama pólipo, que se puede formar en la pared interna del colon o el recto. Con el tiempo, algunos pólipos se pueden volver cancerosos.

La clasificación TNM [3] se divide en tres aspectos que caracterizan al cáncer, que a la vez se subdividen en sus correspondientes estadios. Así, la letra “T” hace referencia a “Tumor”, y junto a ella aparecen números del 1 al 4 para describir el progreso tumoral:

- T1: se observa un crecimiento del tumor en la capa submucosa del intestino.
- T2: el tumor crece en la zona de la lámina muscular propia.
- T3: el tumor ha llegado a la capa subserosa, o bien se ha observado crecimiento del mismo en zonas cercanas al colon.
- T4a: se observa crecimiento del tumor en la totalidad del colon.
- T4b: el tumor crece en otro órgano distinto al colon.

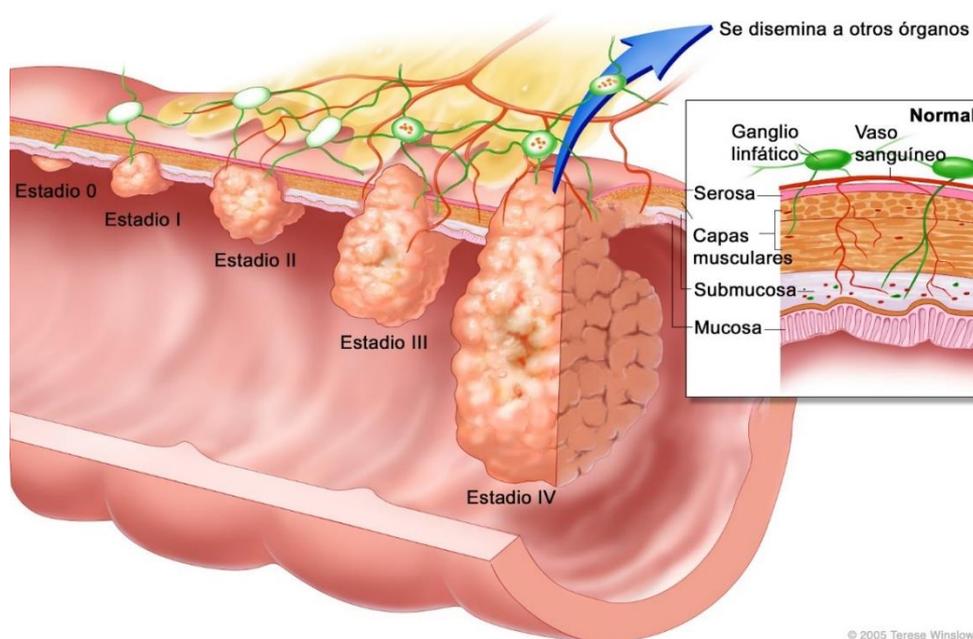
Por otra parte, la letra “N” se refiere a los “Ganglios Linfáticos”, y se subdivide de esta manera:

- N1a: se pueden encontrar células tumorales en un ganglio linfático regional.
- N1b: se encuentran células tumorales en dos o tres ganglios linfáticos regionales.
- N1c: se observan ganglios que están constituidos por células tumorales.
- N2a: se encuentran células tumorales en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales.

- N2b: se observan células tumorales en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

Finalmente, la letra “M” hace referencia a la “Metástasis”, y también se subdivide en varios estadios:

- M1a: el tumor se disemina a otra zona del cuerpo distinta del colon o del recto.
- M1b: el tumor se disemina a más de una zona del cuerpo distinta del colon o del recto.
- M1c: el tumor se disemina a la superficie peritoneal (membrana serosa que reviste el interior abdominal).

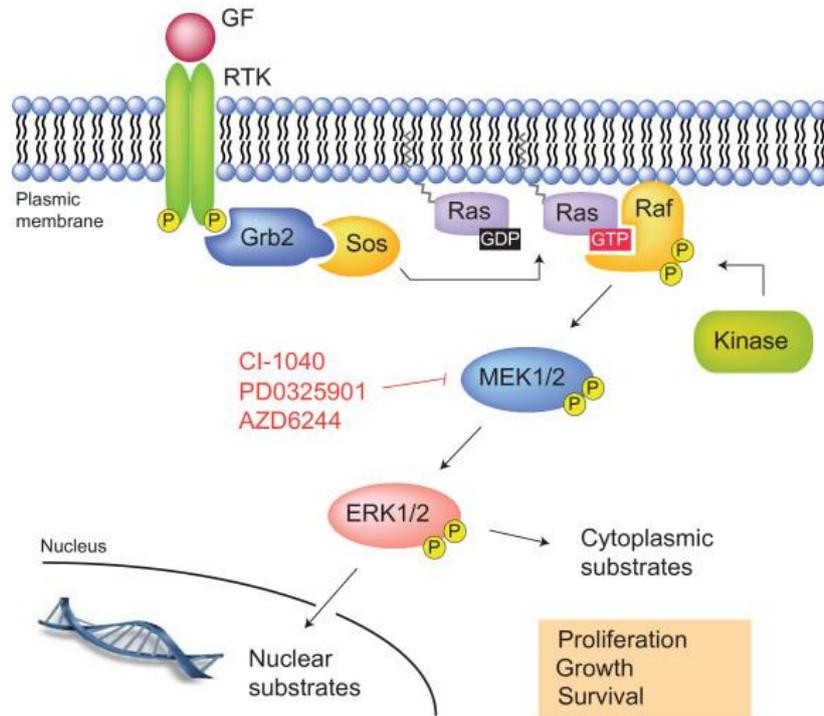


**Figura 5.-** Estadios del Cáncer de Colon. Fuente: Terese Winslow LLC (2005)

### 1.5. La Importancia de la Proteína Ras en el Cáncer de Colon

La proteína Ras es una GTPasa que se encuentra unida a la membrana plasmática, y actúa como transductor intracelular, transmitiendo la señal desde los receptores de la superficie de la célula a los efectores que se encuentran en el citosol. De esta manera, Ras está activo cuando se encuentra unido a GTP, y su inactivación es inducida por las proteínas RasGAP (proteínas activadoras de GTPasas) debido a la hidrólisis del GTP a GDP. Además, Ras se encuentra aguas arriba de muchas rutas, tales

como PI3K – Akt – mTOR o Raf – MEK1/2 – ERK1/2, y aguas abajo del receptor EGFR, que se autofosforila al reconocer al factor de crecimiento epidérmico (EGF), activando las rutas anteriormente mencionadas. Un aspecto importante a considerar de esta última ruta mencionada es que bajos niveles de activación de ERK1/2 promueven la proliferación, mientras que altos niveles de activación ejercen un efecto antagónico [4].



**Figura 6.-** Ruta de señalización de Ras. Fuente: Fremin, C (2010) [5]

Como se ha especificado anteriormente, las proteínas de la familia Ras son importantes en varias rutas de señalización celular. Su sobreexpresión y/o sobreactivación conduce a un aumento de la proliferación celular descontrolada, que en muchos casos lleva a la generación de un tumor. En concreto, los protooncogenes (oncogenes cuando presentan una mutación) más prevalentes de Ras son: K-ras (Kristen-ras), H-ras (Harvey-ras) y N-ras (Neuroblastoma-ras). Los cuales codifican distintas isoformas de la proteína de señalización Ras [6], y presentan distinto porcentaje de aparición de mutaciones producidas en los codones 12, 13 y 61.

Aproximadamente, el 30% de los tumores humanos poseen mutaciones en Ras. Si bien, estas mutaciones son más predominantes en el locus K-ras (25-30%), mientras que las que se dan en N-ras representan el 8% y en H-ras el 3%. Además, existe relación entre estas mutaciones y tipos de tumores

en particular. Así, por ejemplo, las mutaciones en K-ras se dan en un alto porcentaje en tumores de pulmón y colon, además de darse en el adenocarcinoma pancreático ductal.

Más concretamente, las mutaciones que se dan en K-ras están presentes en el 40-45% de los carcinomas colorrectales. Siendo las mutaciones en el codón 12 (80%) y en el 13 (20%) las que más se dan en este tipo de tumores. Se ha de añadir también que la mutación G12D (que supone el cambio de una glicina por un ácido aspártico) es el cambio aminoacídico más frecuente dentro de las mutaciones en el codón número 12 del oncogén K-ras.

Para aquellos tumores que no poseen mutación en Ras y para aquellos que posean un nivel alto de expresión del EGFR, la terapia anti-EGFR utilizando anticuerpos monoclonales es una opción efectiva. Y, además, para los tumores colorrectales, se persigue la administración de mezclas compuestas por anticuerpos anti-EGFR e inhibidores de kinasas, entre otros [7]. Además de recurrir al FOLFOX (5-Fluorouracilo + Leucovín + Oxaliplatino) en tumores de colon no metastáticos, y a terapias combinadas de FOLFOX con anticuerpos anti EGFR como el Cetuximab en tumores de colon metastáticos [8].

Por otro lado, se conoce que las mutaciones que se dan en Ras pueden suponer la resistencia del tumor a diversos fármacos quimioterapéuticos [9].

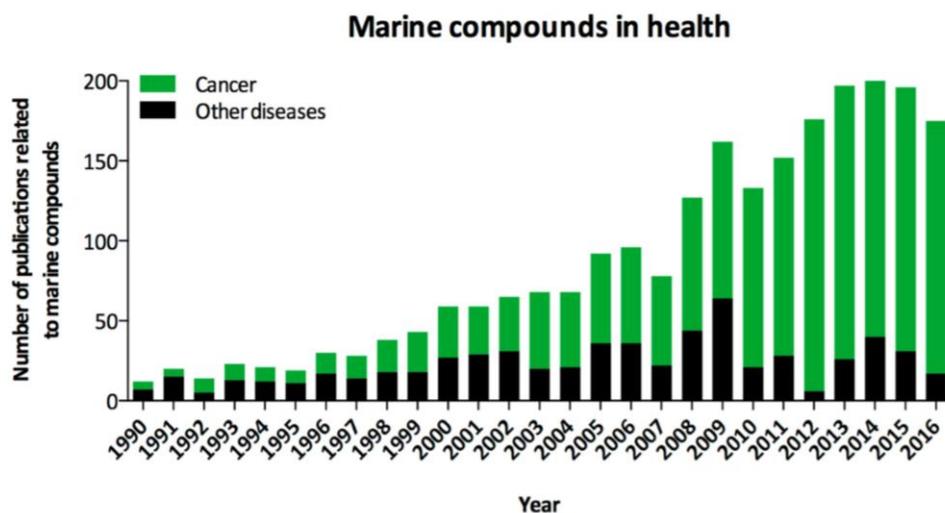
## **1.6. Compuestos Naturales Bioactivos de Origen Marino con Capacidad Antitumoral**

El interés por mejorar la calidad de vida de los pacientes, tratando de aumentar su supervivencia, maximizando el control del tumor y minimizando los efectos secundarios que la quimioterapia pueda generar en ellos, es actualmente uno de los principales retos a nivel clínico y de investigación. Por ello, existe una creciente tendencia a buscar nuevas dianas, moléculas y tratamientos que mejoren a los actuales. En este sentido el medio ambiente marino y los compuestos originados en él son una de las fuentes más inexploradas y con mayor potencial.

Los compuestos naturales marinos suponen un gran interés en el campo de la farmacología debido a muchos aspectos. Estos compuestos han sufrido un proceso de selección natural durante miles de años que les permite unirse a macromoléculas biológicas, sirviendo como modelo para la obtención de análogos. Por otro lado, se ha descubierto que poseen una gran cantidad de funciones de interés, como son la antitumoral, la antiinflamatoria [10], o la antibacteriana [11].

Estos compuestos son frecuentemente metabolitos secundarios provenientes de organismos marinos; mayoritariamente invertebrados. Y son producidos por dichos organismos en respuesta a estímulos o cambios del medio en el que se encuentran.

Se puede observar en la figura 7, cómo desde el año 1990 al año 2016 se ha incrementado gradualmente el número de publicaciones relacionadas con los compuestos marinos. Y a partir del año 2003 la mayoría de publicaciones sobre compuestos marinos han tratado sobre su efecto antitumoral.



**Figura 7.-** Número de publicaciones de compuestos marinos en la salud por año. (Ruiz-Torres, V., et al., 2017)

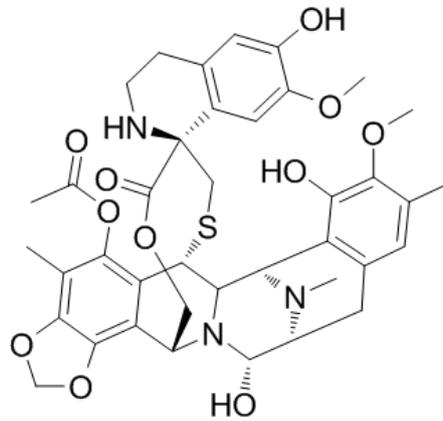
Hasta el año 2016, han sido ocho los compuestos aislados de organismos marinos que han sido aprobados por las autoridades reguladoras. Éstos son: Citarabina, Ziconotida, Trabectedina, Mesilato de eribulina, Brentuximab vedotin, Vidarabina, Ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 y Iota carragenina. De estos ocho, los cinco primeros han sido aprobados para su uso como fármacos para el tratamiento del cáncer, como se puede observar en la siguiente Tabla (Figura 8) [12, 13].

Organization and Year	Compound Name	Marine Organism	Chemical Class	Disease Area	Mode of Action	Company or Institution
FDA 1969	Cytarabine (Ara-C)	Sponge	Nucleoside	Anticancer	DNA polymerase inhibitor	Bedford, Enzon
FDA 2004	Ziconotide	Cone snail	Peptide	Pain	Modulator of neuronal calcium channels	Neurex Corp
EMEA 2007	Trabectedin (E7389)	Tunicate	Alkaloid	Anticancer	Inhibits cancer cell growth of and affects the tumor microenvironment	PharmaMar
FDA 2010	Eribulin mesylate (E7389)	Sponge	Macrolide	Anti-breast cancer	Microtubule interfering agent	Eisai Inc.
FDA 2011	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Mollusk	Antibody-drug conjugate	Lymphoma	CD30-directed antibody-cytotoxic drug conjugate	Seattle Genetics Inc.

**Figura 8.-** Listado de compuestos marinos con actividad antitumoral aprobados por la EMEA (*European Medicines Agency*) y la FDA (*Food and Drug Administration*). Fuente: (Ruiz-Torres, V., et al., 2017)

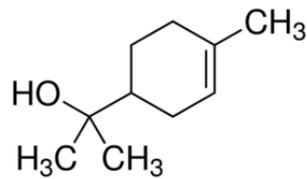
En cuanto a la clasificación química de los compuestos marinos las familias más comunes son:

- Alcaloides



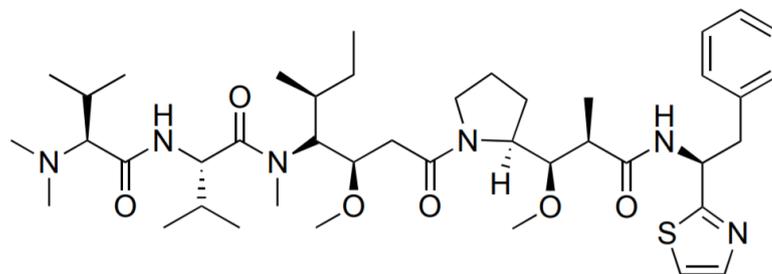
**Figura 9.-** Estructura de un alcaloide (Trabectedina). Fuente: Focus Bioscience

- Terpenos



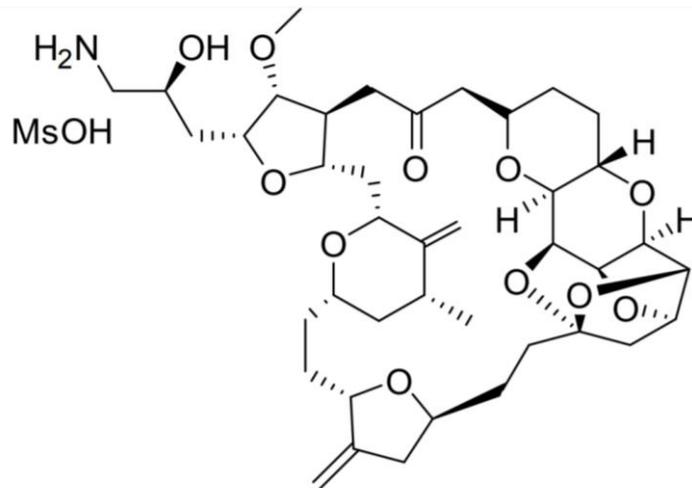
**Figura 10.-** Estructura molecular de un terpeno (Terpineol). Fuente: Sigma-Aldrich

- Péptidos



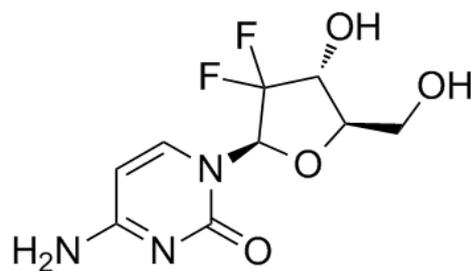
**Figura 11.-** Estructura molecular de un péptido (Dolastatina 10). Fuente: Negi, B. (2017)

- Policétidos



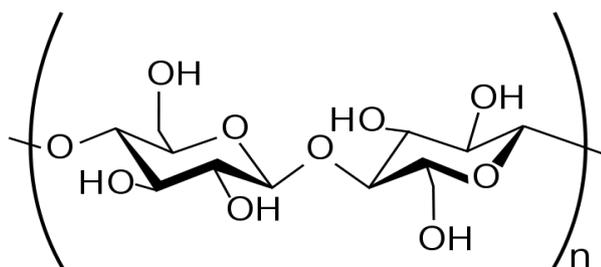
**Figura 12.-** Estructura molecular de un policétido (Mesilato de eribulina). Fuente: Lorente, A., et al. (2014)

- Análogos de nucleósidos



**Figura 13.-** Estructura molecular de un análogo de nucleósido (Gemcitabina). Fuente: MedChemExpress

- Carbohidratos



**Figura 14.-** Estructura molecular de un carbohidrato. Fuente: Biochempages

Sobre los carbohidratos de origen marino no hay estudios de actividad antitumoral. Si bien, sobre los análogos de nucleósidos como la Gemcitabina y la Citarabina, se ha reportado una actividad inhibidora de la síntesis de ADN, pues debido a su estructura similar a la base nitrogenada citosina, son incorporados en cadenas de ADN que están siendo sintetizadas.

En cuanto a los policétidos, el único aprobado hasta la fecha es el Mesilato de eribulina, cuyo mecanismo de acción parece ser la inhibición de la dinámica (polimerización y despolimerización) de los microtúbulos, causando de esta manera la apoptosis de la célula [14].

Sobre los péptidos de origen marino con actividad antitumoral, cabe señalar el grupo de las Dolastatinas, las cuales son capaces de inducir la apoptosis celular a través de distintos modos de acción, como son: el incremento de la expresión de la proteína p53, la subexpresión de la proteína Bcl-2, y la interferencia de la dinámica de los microtúbulos [15].

Por otro lado, se ha de destacar que la Trabectedina (clasificada como alcaloide) fue el primer compuesto marino que se aprobó como antitumoral en Europa. Y su mecanismo de acción se basa en inhibir la unión que se da entre los factores de transcripción y el ADN, imposibilitando así que se dé la transcripción de éste [12].

Además de los fármacos ya aprobados, existen otros que a fecha se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos. Así, la Gemcitabina, que es un derivado de la Citarabina (la cual procede de la esponja *Cryptotheca crypta*), se encuentra en la fase clínica III. Por otro lado, el alcaloide PM-10450 está en fase clínica I/II [16], el péptido LAF389 se encuentra en fase clínica I [17], y el policétido Briostatina-1 está en fase clínica I [18]. Sin embargo, no hay terpenos en fases clínicas que testen su efecto anticancerígeno, pero sí en otras enfermedades distintas al cáncer.

Dentro de su actividad antitumoral, los compuestos marinos poseen una gran diversidad de funciones, como son:

- Inhibir el crecimiento celular.
- Inhibir la polimerización de la tubulina.
- Impedir la angiogénesis, la metástasis, la invasión y la migración.
- Inducir la autofagia y la apoptosis.

A nivel más molecular, se han clasificado como inhibidores de kinasas varios compuestos marinos procedentes de esponjas. Así, la Himenialdisina y la Debromohimenialdisina son inhibidores de la kinasa MEK, impidiendo de esta manera la fosforilación de ERK. Y algunos miembros del grupo de las Dolastatinas, las cuales se han mencionado anteriormente, inhiben los centros activos de PI3K y de AKT, impidiendo la sobreexpresión de ambas proteínas [19].

## **2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

### **2.1. Antecedentes**

En trabajos previos del Grupo de Investigación de Compuestos Naturales Bioactivos, se ha llevado a cabo el análisis de la actividad antiproliferativa de varios extractos marinos, incluidos los utilizados en este trabajo.

En dichos análisis, se han observado los distintos mecanismos de muerte que ejercen estos extractos sobre algunas líneas celulares en las que se han testado, se ha llevado a cabo un análisis de migración celular y se ha estudiado la capacidad de formación de colonias celulares. Además, se ha analizado la expresión de distintas proteínas relacionadas con rutas de proliferación y metabolismo energético como mTOR, en busca del mecanismo de acción de algunos de los extractos empleados en este trabajo.

El presente trabajo parte de estas investigaciones previas del grupo de investigación con el objetivo de ampliar el conocimiento de la acción de estos extractos a otras líneas celulares de cáncer de colon y conocer la relación de K-Ras, una de las dianas moleculares más importantes en cáncer de colon, con dichos extractos.

### **2.2. Objetivos**

Los objetivos de este trabajo son:

- Analizar la actividad antitumoral de 3 extractos de origen marino, en líneas celulares de cáncer de colon mutantes y no mutantes de la proteína de señalización intracelular K-Ras.
- Obtener las  $IC_{50}$  de los extractos probados para cada una de las líneas celulares mediante la técnica MTT, y definir cuál de ellos es el más citotóxico.
- Analizar la expresión de la proteína K-Ras mediante la técnica Western Blot tras haber tratado las líneas celulares con los extractos marinos.
- Buscar correlación entre la  $IC_{50}$  y la expresión de la proteína K-Ras.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Líneas Celulares y Mantenimiento**

En este trabajo se utilizaron cinco líneas de cáncer de colon: SW480, SW620, HCT116, HGUE-C-1 y HT-29. Cuatro de ellas fueron obtenidas de la colección ATCC, mientras que la línea HGUE-C-1 fue establecida a partir de un tumor primario procedente de un paciente del Hospital General Universitario de Elche.

Todas ellas fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium alto en glucosa (4,5 g/L).

Para su mantenimiento, las anteriores líneas fueron subcultivadas cuando llegaron a una confluencia del 70 – 80%. Para ello, las células se lavaron con PBS – EDTA al 0,05%, y tras retirarlo se añadió tripsina; enzima que permite la disgregación celular. Se neutralizó con medio DMEM fresco, y se subcultivaron volúmenes variables a un frasco nuevo.

Por último, se introdujeron los frascos en un incubador que mantiene las condiciones de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2. Caracterización Molecular de los Extractos mediante HPLC-ESI-QTOF-MS**

Los extractos marinos utilizados fueron 3, denominados PS, CR y NB respectivamente. El primero de ellos se obtuvo a partir de una holoturia, el segundo a partir de un coral blando y el tercero a partir de un nudibranquio. Los extractos fueron obtenidos por el grupo de investigación mediante una extracción líquido-líquido empleando diferentes disolventes orgánicos.

La caracterización preliminar de la composición cualitativa cada uno de ellos se llevó a cabo mediante la técnica de HPLC-ESI-QTOF-MS [20] en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Segura de la Universidad de Granada. Dicha técnica consiste, en primer lugar, en la separación de los compuestos que se hallan en el extracto mediante su paso por una columna de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC; *High Performance Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés) utilizando para ello una fase estacionaria (resina) y una fase móvil (disolvente).

Tras ello, los compuestos que abandonan el HPLC son enviados al dispositivo de Ionización por Electrospray (ESI; *Electrospray Ionization*, por sus siglas en inglés), con el objetivo de ionizar dichas moléculas [21]. Para, finalmente, ser analizadas mediante espectrometría de masas, utilizando para ello un analizador del tipo cuadrupolo (el cual separa los iones según su relación masa/carga) acoplado

a un analizador del tipo Tiempo de vuelo (TOF; *Time Of Flight*, por sus siglas en inglés) que permite determinar la masa de los analitos al medir el tiempo transcurrido desde la entrada de éstos al TOF hasta su impacto en el detector.

### **3.3. Ensayo de Citotoxicidad mediante MTT**

Este ensayo mide la viabilidad celular tras el tratamiento que se aplica a las células anteriormente citadas.

El reactivo que se usa es el MTT, o Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo, que es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto conocido como Formazán, brindando así cristales de color púrpura. Permitiendo, tras la disolución de los mismos con DMSO, una cuantificación mediante espectrofotometría [22]. Una vez hecha la lectura a 570 nm y 620 nm, se recurre al programa informático GraphPad Prism versión 6 con el objetivo de obtener la gráfica dosis – respuesta inhibitoria y el dato de la  $IC_{50}$ , que es la concentración de extracto a la cual la viabilidad celular se reduce a la mitad con respecto al control. Añadir que, en este caso, se hace con respecto al control con DMSO por ser el vehículo en el que se encuentran disueltos los extractos.

Para estos ensayos se usan placas de 96 pocillos, y se establecen 10 condiciones con 6 réplicas por cada una de ellas. Dos de ellas pertenecen a controles, los cuales son el control de células sin tratar y el control con DMSO (disolvente orgánico utilizado como vehículo en los extractos marinos usados). Y las otras 8, corresponden a condiciones crecientes de extracto.

### **3.4. Ensayo Western Blot de Expresión de Proteínas**

Para este ensayo se han sembrado las líneas celulares HCT116 y HGUE-C-1 en placas de 6 pocillos. En las cuales, en cada una de ellas se han probado 3 condiciones por duplicado, para cada uno de los 3 extractos.

Una vez sembradas las células, se espera 24 horas, y se procede a tratarlas con el correspondiente extracto. Tras lo cual, se vuelve a esperar otras 24 horas. Una vez cumplidas, se levantan las células del fondo de las placas y se llevan a tubos de 15 mL, en los cuales tras añadir el tampón de lisis RIPA se extraerán las proteínas contenidas en las células. Así, tras ello, se procede a la cuantificación de proteína total en cada uno de los tubos, usando para ello la recta patrón de BCA y reactivos de Pierce.

Una vez cuantificada la proteína total, se procede a cargar 30 µg de proteína total y a realizar la electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Y, a continuación, se da paso a realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Además, para corroborar que ha habido transferencia, se tiñe la membrana con reactivo de Ponceau.

Tras ello, se procede al bloqueo de la membrana con leche en polvo al 5% en PBS-EDTA al 0,1%, se introducen las membranas en tubos que contienen los anticuerpos primarios siguientes: rabbit anti-β-actina (MABT523, Merck Millipore., Darmstadt, Alemania), el cual se une a la proteína β-actina y permite así cuantificarla para poder normalizar el valor de expresión de la proteína K-Ras; y mouse anti-KRAS (sc-30, St. Cruz Biotech., Heidelberg, Alemania), el cual se une a la proteína K-Ras y permite analizar la expresión de ésta. Posteriormente se mantienen en agitación a 4°C durante toda la noche. Finalmente, se introducen las membranas en tubos con los anticuerpos secundarios siguientes: anti-rabbit (A 6154, Sigma Aldrich., Darmstadt, Alemania) y anti-mouse (A 4416, Sigma Aldrich., Darmstadt, Alemania). Éstos se unen a los anticuerpos primarios, y debido a la enzima HRP que poseen anclada en su región constante permiten la inmunodetección en el lector SPECTROstar Omega de BMG Labtech [23].

Los resultados obtenidos son analizados con el programa Image J, que brinda la posibilidad de cuantificar la expresión de proteína mediante la densitometría de las bandas obtenidas.

### **3.5. Análisis Estadístico ANOVA two-way**

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el análisis estadístico ANOVA two-way, el cual permite conocer si existe significancia del efecto de dos variables sobre la medida obtenida.

En el presente trabajo, dicho análisis se utilizó para saber el grado de significancia, en caso de que la haya, entre valores pertenecientes a distintos extractos en una misma línea celular, y entre valores pertenecientes a los mismos extractos para distintas líneas celulares, en el ensayo de viabilidad celular. Además, se usó en el ensayo de expresión de la proteína K-Ras para conocer si existía significancia, y el grado de ésta, entre los niveles de proteína para un mismo extracto, y entre los niveles de proteína para distintos extractos en la misma condición.

De esta manera, se definió arbitrariamente que, en caso de que la significancia entre dos valores resulte menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ) se añade un asterisco (\*), en caso de que la significancia resulte menor de 0,01 ( $p < 0,01$ ) se añaden dos asteriscos (\*\*), si la significancia resulta menor de 0,001 ( $p < 0,0001$ ) se añaden tres asteriscos (\*\*\*), y si la significancia es menor de 0,0001 ( $p < 0,0001$ ) se señala con cuatro asteriscos (\*\*\*\*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización Molecular de los Extractos mediante HPLC-ESI-QTOF-MS

En primer lugar, se realizó, en colaboración con la Universidad de Granada, el análisis de la composición de los diferentes extractos tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos. De este análisis se obtuvo la composición cualitativa de cada uno de los tres extractos. A continuación, en las figuras siguientes se muestra la agrupación de los compuestos identificados por familias estructurales. Si bien, en dichas figuras no se muestran los compuestos detectados pero no identificados (pendientes de identificar), que en algunos casos llegan al 70%.

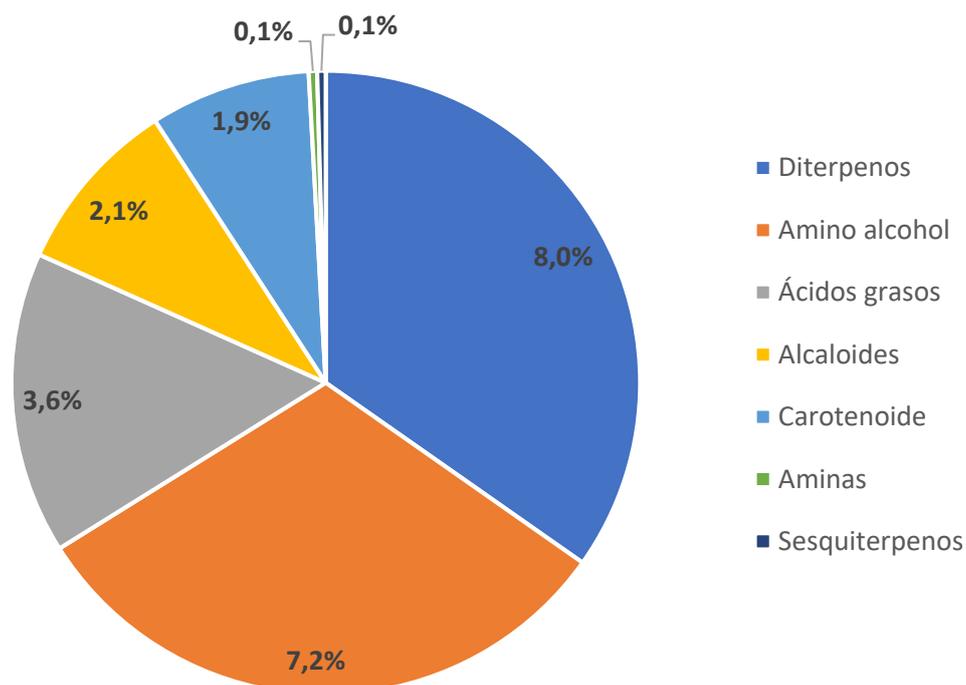
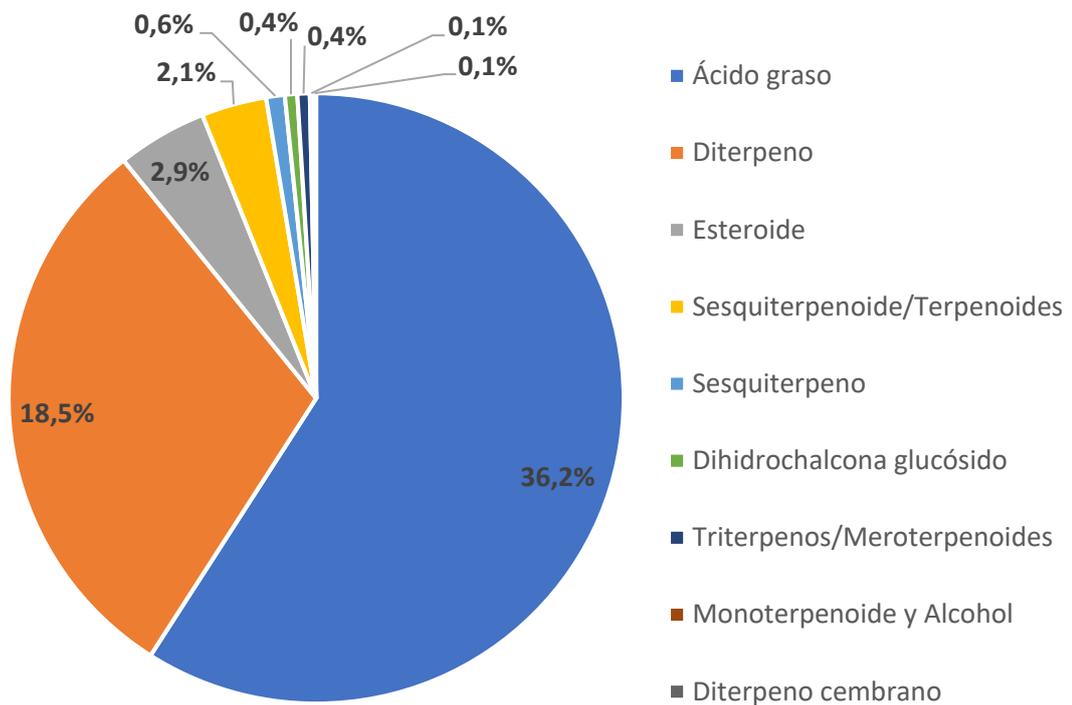
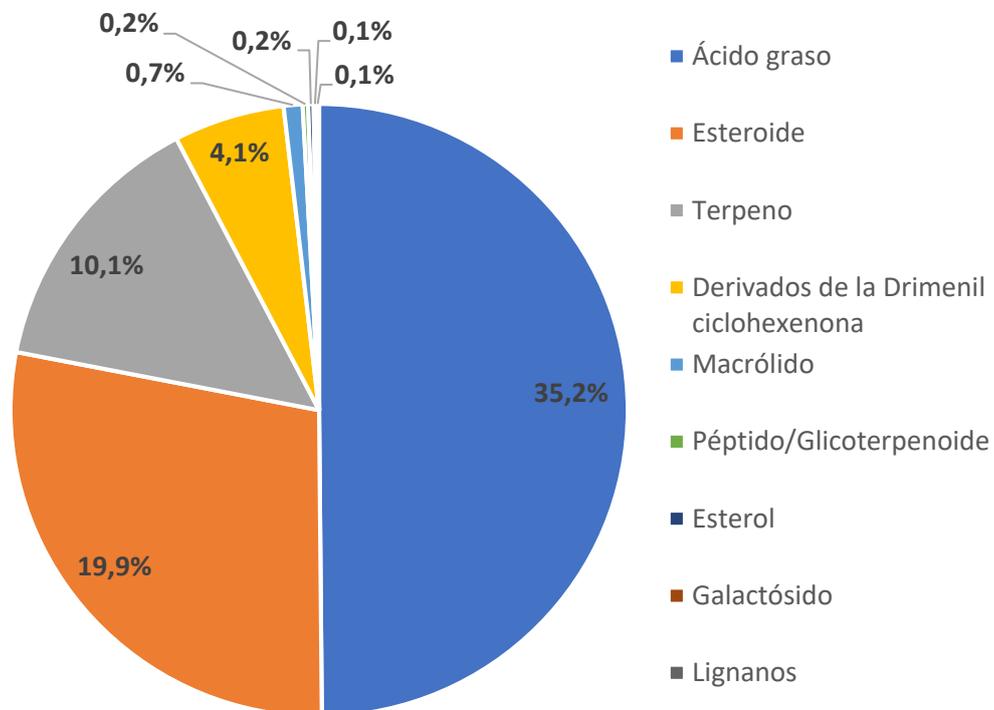


FIGURA 15.- Caracterización del Extracto PS



**FIGURA 16.-** Caracterización del Extracto CR



**FIGURA 17.-** Caracterización del Extracto NB

## 4.2. Ensayo de Viabilidad Celular

El ensayo de viabilidad celular permite analizar la capacidad citotóxica de los 3 extractos con los que se trataron a las 5 líneas celulares de cáncer de colon. De esta manera se obtuvieron un total de 15 curvas dosis-respuesta, correspondientes a las diferentes parejas extracto/línea celular existentes.

Cabe destacar que el eje Y, en las gráficas siguientes, corresponde al porcentaje de viabilidad celular, el cual es máximo (100%) cuando las células no son tratadas con los extractos, y va disminuyendo conforme aumenta la concentración de éstos; la cual se representa transformada a logaritmo decimal en el eje X.

Una vez obtenidas las gráficas sigmoideas de dosis-respuesta inhibitoria, se procedió a solapar para cada línea celular, las tres gráficas que corresponden a los tres extractos con los que se han tratado éstas. De esta manera, se puede apreciar a simple vista la potencia de cada uno de los extractos en cada una de las líneas celulares.

Además, de estas gráficas se obtiene un valor con una alta importancia en el ámbito de los ensayos de viabilidad celular; y es la  $IC_{50}$ . De la cual se procederá a hablar posteriormente con más detalle.

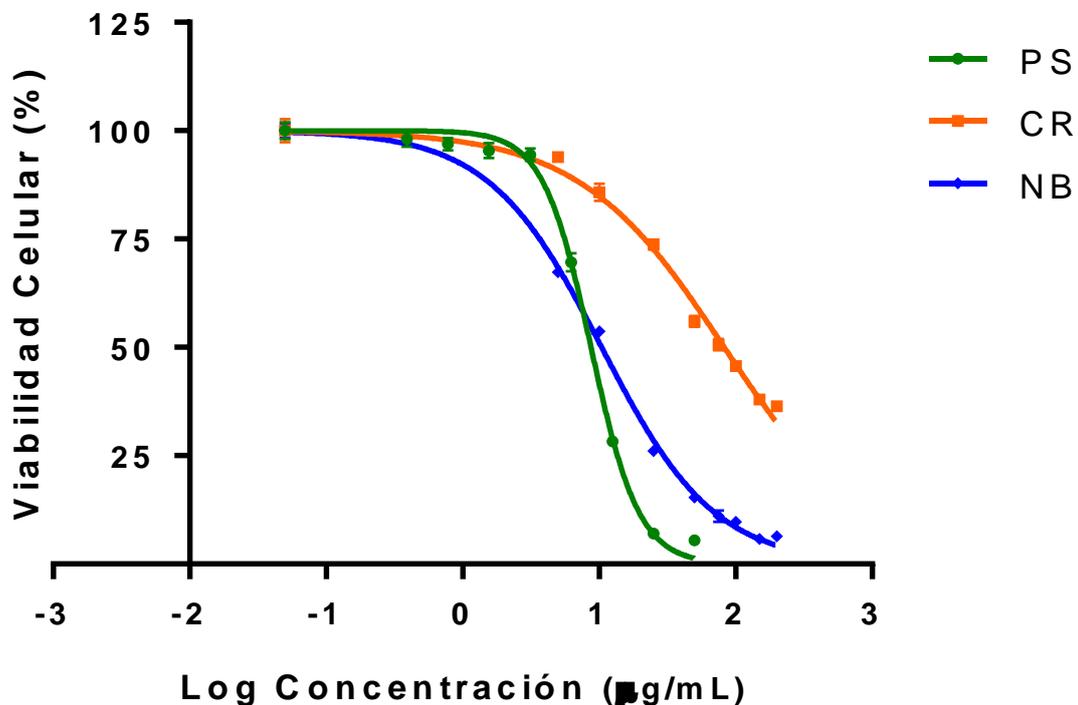


Figura 18.- Curvas dosis-respuesta de la línea SW480 para los 3 extractos marinos

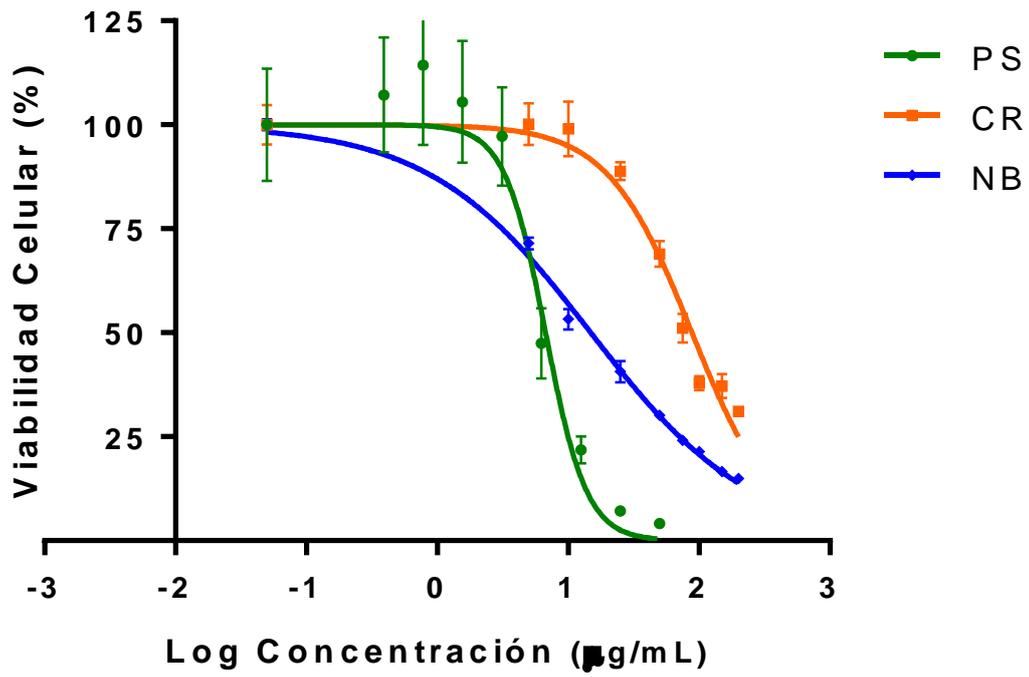


Figura 19.- Curvas dosis-respuesta de la línea SW620 para los 3 extractos marinos

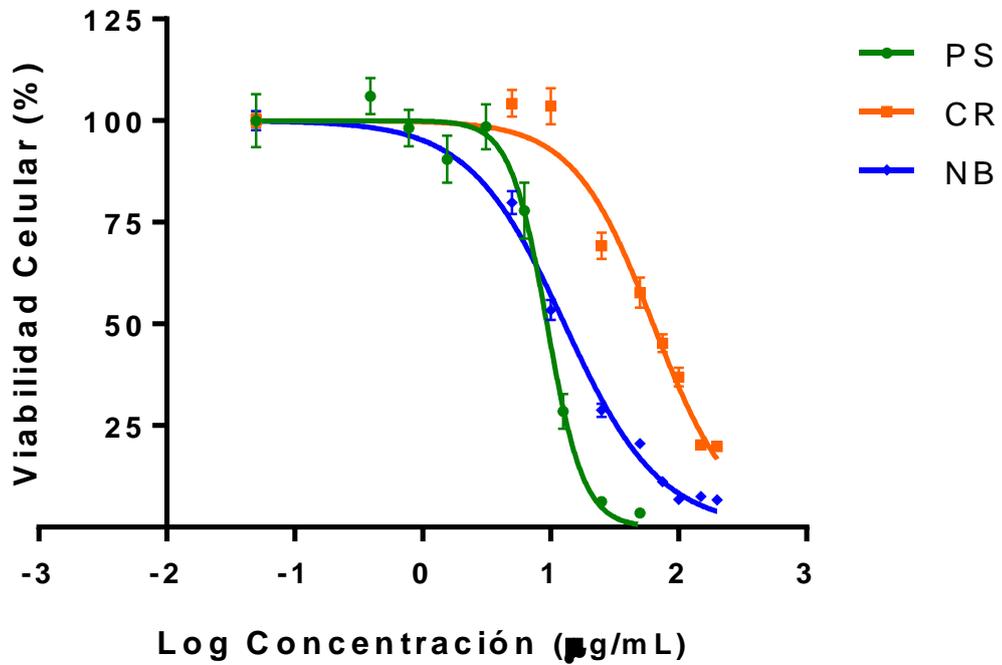


Figura 20.- Curvas dosis-respuesta de la línea HCT116 para los 3 extractos marinos

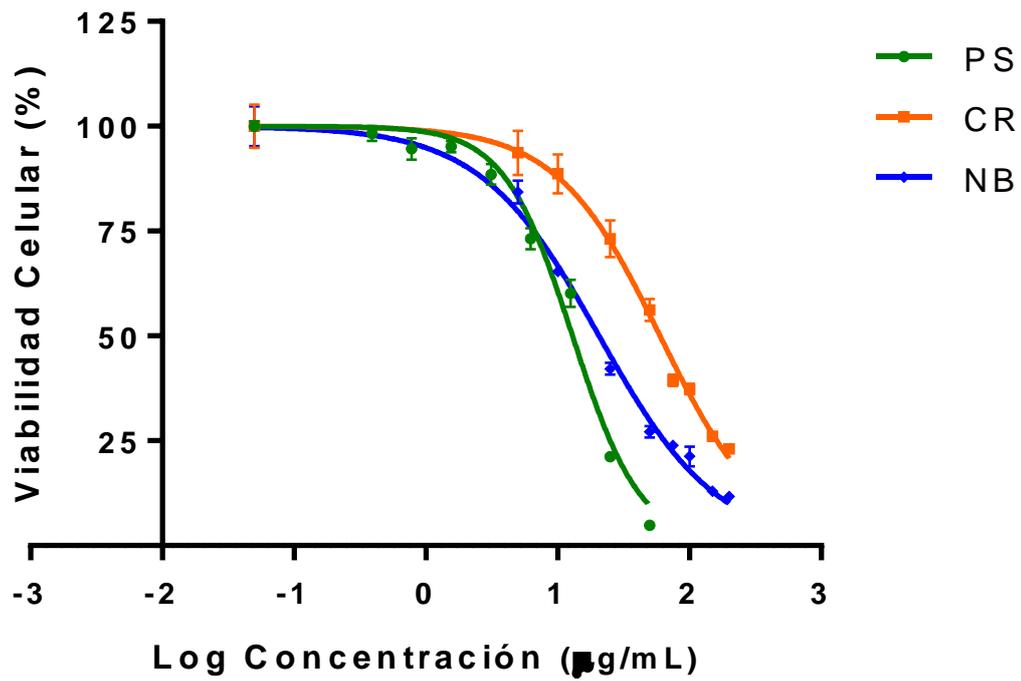


Figura 21.- Curvas dosis-respuesta de la línea HGUE-C-1 para los 3 extractos marinos

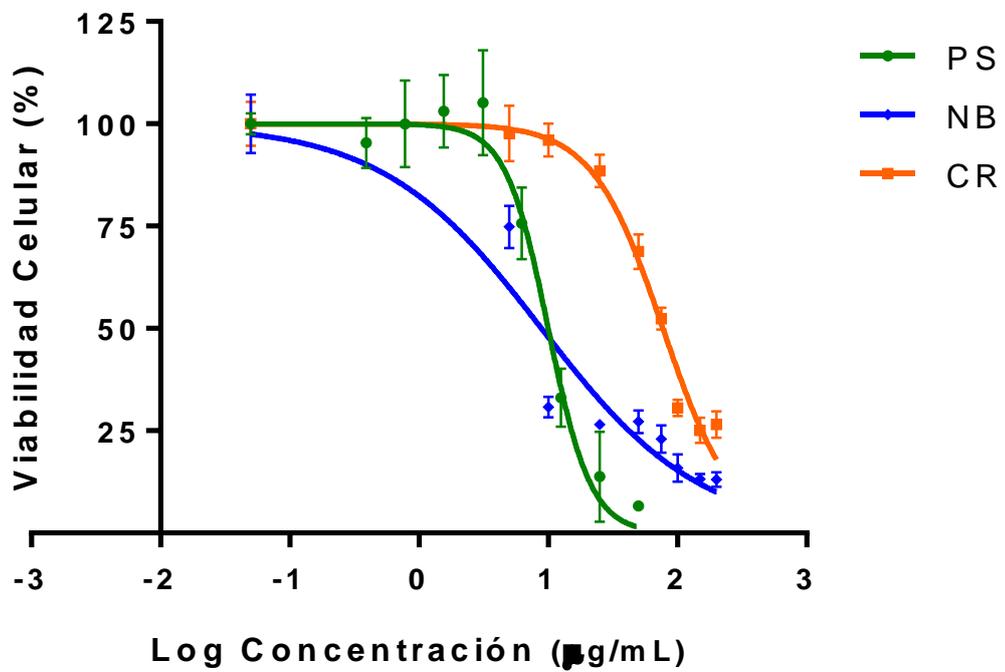


Figura 22.- Curvas dosis-respuesta de la línea HT-29 para los 3 extractos marinos

#### 4.2.1. Tabla de valores de IC<sub>50</sub>

En el siguiente apartado se presenta la tabla de valores IC<sub>50</sub> obtenidos de las gráficas dosis-respuesta anteriores.

	Extracto PS	Extracto CR	Extracto NB
Línea SW480	8,72 ± 0,49 µg/mL	82,44 ± 7,49 µg/mL	10,43 ± 0,73 µg/mL
Línea SW620	6,72 ± 0,88 µg/mL	88,26 ± 11,81 µg/mL	14,81 ± 1,56 µg/mL
Línea HCT116	9,37 ± 1,10 µg/mL	63,19 ± 9,29 µg/mL	12,83 ± 1,45 µg/mL
Línea HGUE-C-1	12,97 ± 1,59 µg/mL	59,86 ± 6,09 µg/mL	20,62 ± 2,41 µg/mL
Línea HT-29	10,00 ± 0,95 µg/mL	77,20 ± 4,79 µg/mL	8,87 ± 2,29 µg/mL

La IC<sub>50</sub> se define como la concentración de extracto a la cual se reduce la viabilidad celular en un 50%. Por ello, un valor de IC<sub>50</sub> bajo se traduce en una mayor potencia del extracto, mientras que valores de IC<sub>50</sub> superiores indican que el extracto es menos potente. De esta manera, se puede observar que el extracto PS es más efectivo en todas las líneas celulares, menos en HT-29, para la cual el extracto más efectivo es el NB.

Además, el extracto proveniente del coral blando (CR) tiene una capacidad antiproliferativa menor que los extractos que provienen de la holoturia (PS) y del nudibranquio (NB).

#### 4.2.2. Análisis estadístico ANOVA two-way

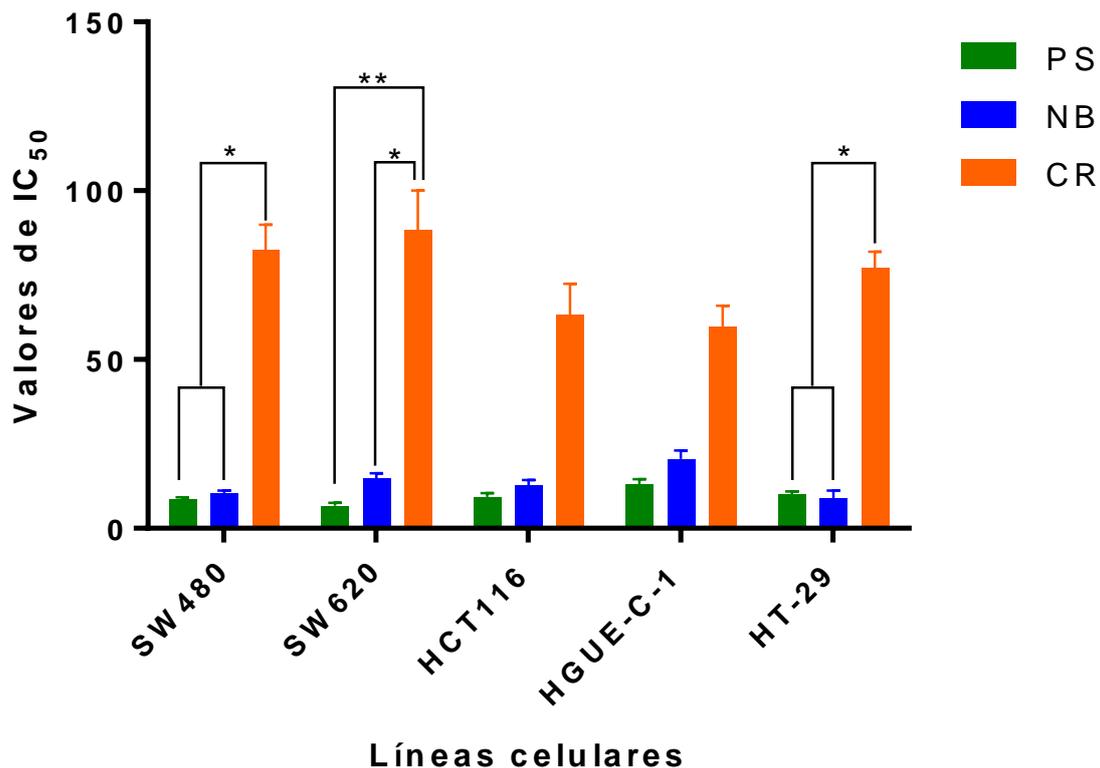
Una vez obtenidos los valores anteriores de IC<sub>50</sub>, se procedió a llevar a cabo el análisis estadístico ANOVA two-way, que ayuda a conocer la significancia entre las variables “extracto” (PS, CR y NB) y “línea celular” (SW480, SW620, HCT116, HGUE-C-1 y HT-29). Y se representa en la Figura 20.

En dicha Figura se puede observar que los valores de IC<sub>50</sub> para los extractos PS y NB difieren significativamente del valor de IC<sub>50</sub> del extracto CR en la línea celular SW480, con una significancia menor de 0,05 (\*,  $p < 0,05$ ) e indicando que éste es el extracto menos activo en esta línea.

En el caso de la línea SW620, el valor de IC<sub>50</sub> para el extracto PS difiere significativamente del valor de IC<sub>50</sub> para el extracto CR, con una significancia menor de 0,01 (\*\*,  $p < 0,01$ ). Y, además, el valor de IC<sub>50</sub> para el extracto NB difiere significativamente del valor de IC<sub>50</sub> para el extracto CR, con una significancia menor de 0,05 (\*,  $p < 0,05$ ).

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IC<sub>50</sub> de los tres extractos ni entre las líneas HCT116 ni en la HGUE-C-1. Por último, en la línea HT-29, los valores de IC<sub>50</sub> para los extractos PS y NB difieren significativamente del valor de IC<sub>50</sub> para el extracto CR, con una significancia menor de 0,05 (\*,  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, se ha de añadir que un segundo ensayo ANOVA two-way, en este caso para comparar el mismo extracto en distintas líneas celulares, no rindió ningún valor de significancia.



**Figura 23.-** Análisis estadístico ANOVA two-way: valores de IC<sub>50</sub> frente a líneas celulares

#### 4.3. Ensayo de Expresión de la proteína K-Ras

Con el fin de estudiar la influencia de los extractos en la expresión de la proteína K-Ras, se decidió realizar ensayo de Western Blot para dicha proteína tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. Para este caso, se seleccionaron únicamente dos líneas celulares representativas: HCT116 (mutante de K-Ras) y HGUE (no mutante de K-Ras), y se estudiaron los niveles de expresión de Ras en presencia de cada extracto marino a dos concentraciones diferentes. Tomando como base los valores de IC<sub>50</sub>, para los extractos PS y CR se probaron concentraciones de 5 µg/mL y 10 µg/mL, mientras que el extracto CR, al ser menos activo, se probó a 12,5 µg/mL y 25 µg/mL.

### 4.3.1. Western Blot de la línea HCT116

#### Extracto PS

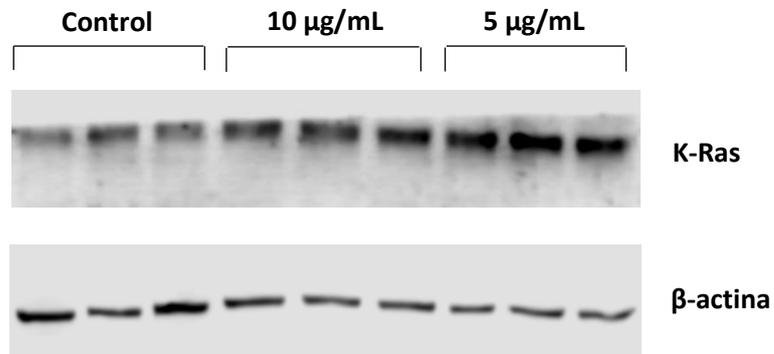


Figura 24.- Western Blot de la línea HCT116 con extracto PS

#### Extracto CR

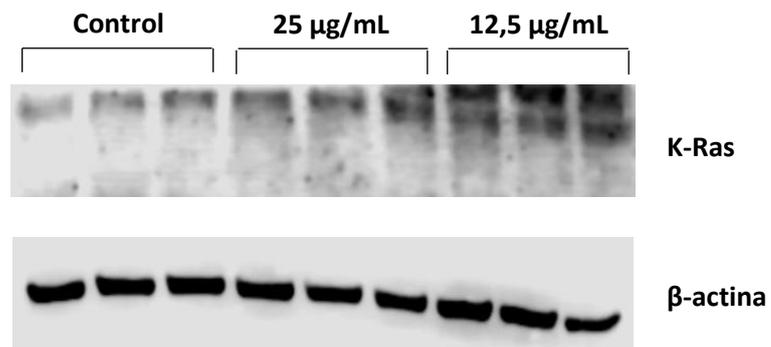


Figura 25.- Western Blot de la línea HCT116 con extracto CR

#### Extracto NB

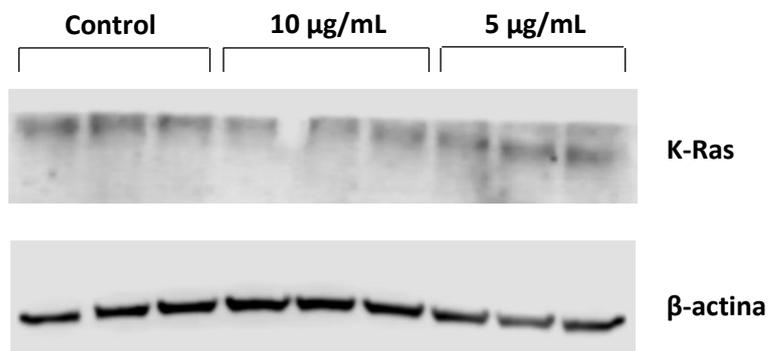
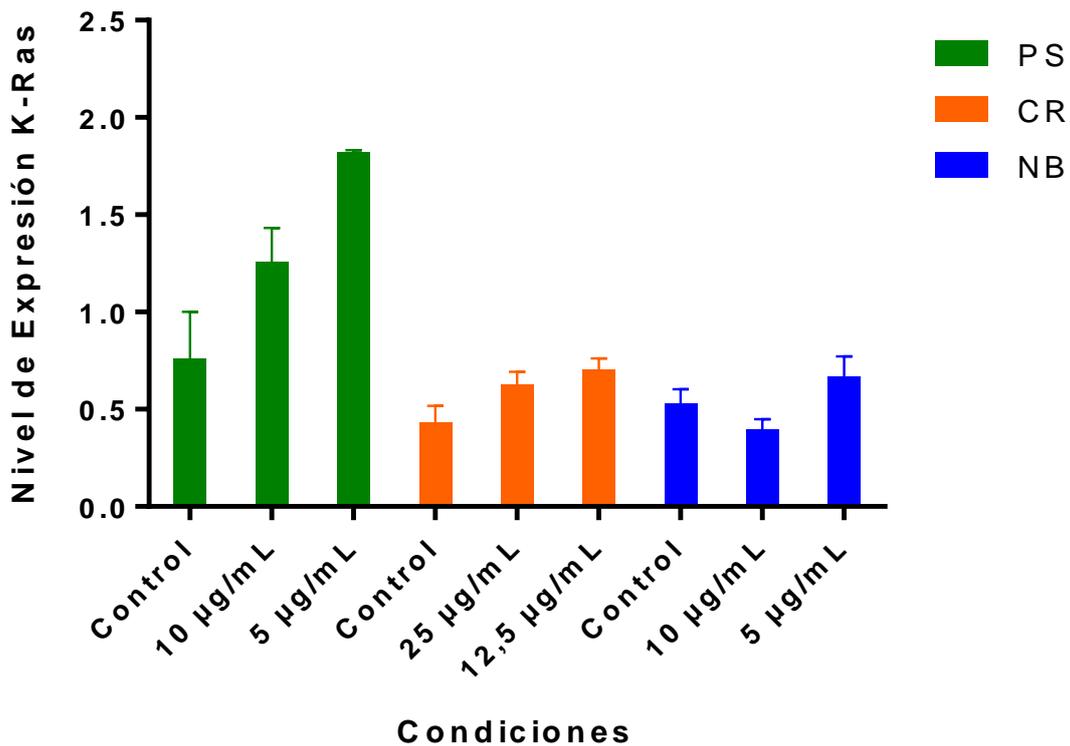


Figura 26.- Western Blot de la línea HCT116 con extracto NB

#### 4.3.2. Niveles de Expresión de la Proteína K-Ras en la línea HCT116

Una vez llevada a cabo la cuantificación de la expresión de proteína mediante el programa Image J, se procedió a normalizar los valores de la proteína K-Ras con los valores de la proteína Beta-actina (pues esta proteína del citoesqueleto posee una expresión constitutiva en las células).

Así, se obtienen los niveles de expresión de la proteína K-Ras para cada uno de los extractos con los que se trata a la línea HCT116. Lo cual se representa a continuación.



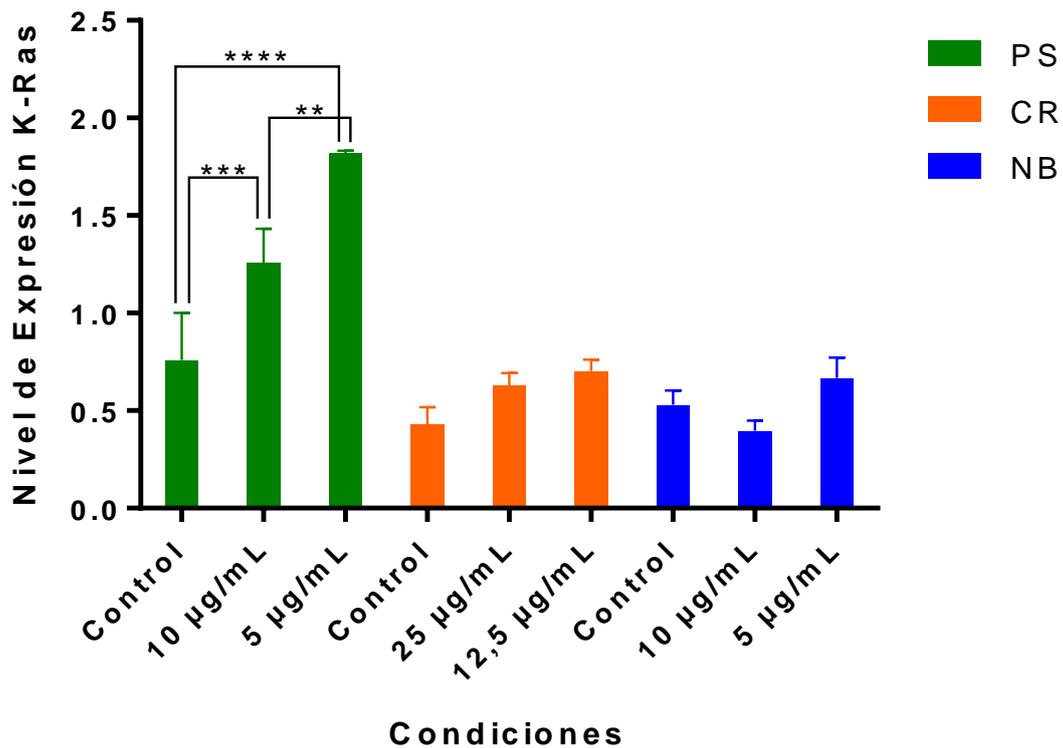
**Figura 27.-** Gráfico del nivel de expresión de K-Ras frente a condiciones de los extractos

En dicho gráfico se puede observar que los tres extractos presentan un efecto sobre los niveles de expresión de la proteína K-Ras. Así, mientras los niveles de K-Ras difieren ligeramente del control al haber sido tratadas las células con los extractos CR y NB, con el extracto PS los niveles de tal proteína aumentan de manera sustancial.

### 4.3.3. Análisis estadístico ANOVA two-way de la línea HCT116

Tras obtener los niveles de expresión de K-Ras para cada extracto en cada una de las condiciones determinadas, se procede a realizar un análisis estadístico ANOVA two-way.

En primer lugar, se ha llevado a cabo dicho análisis para comprobar si existe significancia entre niveles de expresión de K-Ras dentro de cada uno de los extractos. Obteniendo el gráfico que se muestra a continuación.

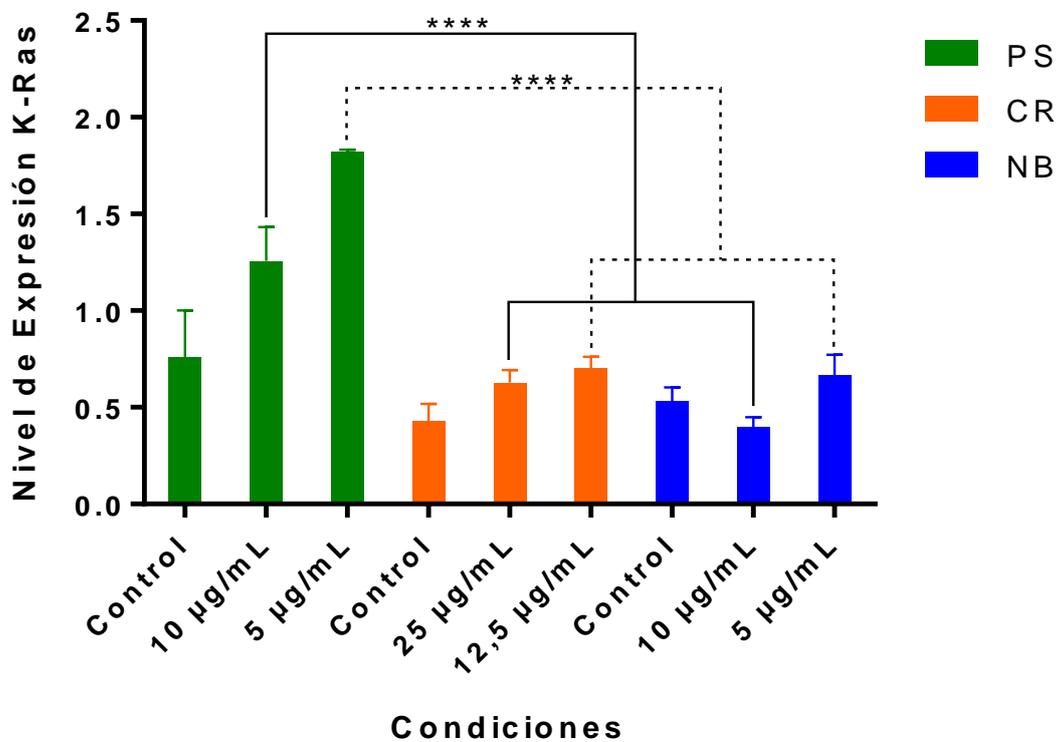


**Figura 28.-** Análisis estadístico ANOVA two-way: nivel de expresión de K-Ras frente a condiciones

De este anterior gráfico se extrae que los niveles de K-Ras para la concentración de 5 µg/mL de extracto PS difieren significativamente de los del control; obteniendo una significancia menor de 0,0001 (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ). Además, los niveles de proteína K-Ras del control también difieren significativamente de los de la concentración de 10 µg/mL de extracto PS, con una significancia menor de 0,001 (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). Y, por último, se obtiene que los niveles de K-Ras para la concentración de 5 µg/mL de extracto PS difieren significativamente de los de la concentración de 10 µg/mL del mismo extracto, resultando una significancia menor de 0,01 (\*\*,  $p < 0,01$ ).

No existen diferencias entre la acción de los extractos CR y NB en las muestras analizadas, indicando que, a diferencia del extracto PS, los extractos CR y NB no modifican los niveles de expresión de K-Ras en la línea HCT116.

En segundo lugar, se ha llevado a cabo otro análisis ANOVA two-way con el objetivo de comprobar si existen diferencias significativas entre los niveles de proteína K-Ras para una misma condición y distinto extracto. Y se representa en la Figura 26. De este gráfico se puede destacar que los niveles de proteína K-Ras, tanto para la concentración más baja como la más alta de extracto PS, difieren significativamente de los de la obtenidos con los extractos CR y NB, con una elevada significancia (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 29.-** Análisis estadístico ANOVA two-way: nivel de expresión de K-Ras frente a condiciones

#### 4.3.4 Western Blot de la línea HGUE-C-1

##### Extracto PS

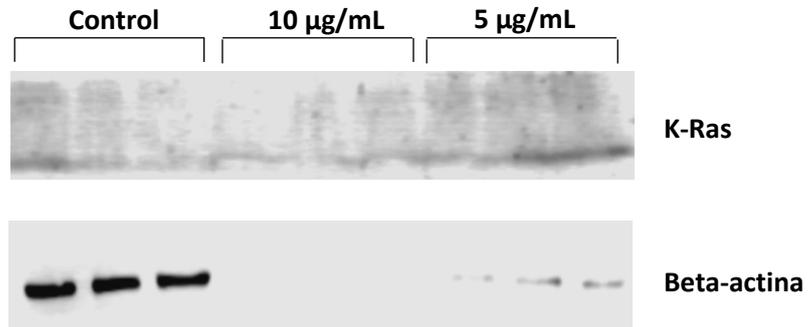


Figura 30.- Western Blot de la línea HGUE-C-1 con extracto PS

##### Extracto CR

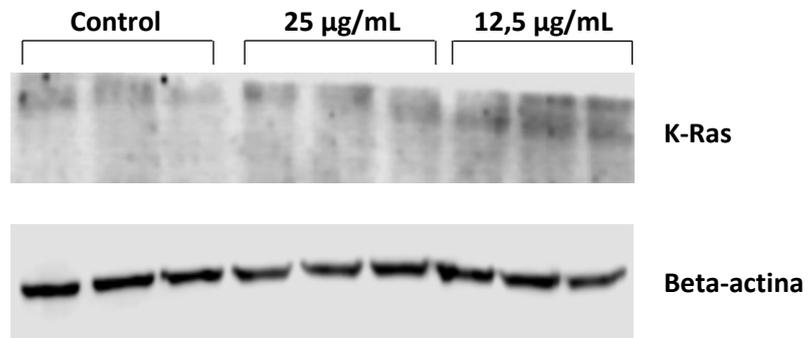


Figura 31.- Western Blot de la línea HGUE-C-1 con extracto CR

##### Extracto NB

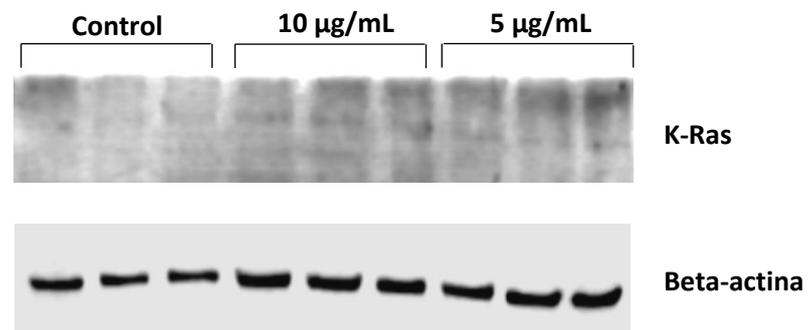


Figura 32.- Western Blot de la línea HGUE-C-1 con extracto NB

#### 4.3.5 Niveles de Expresión de proteína K-Ras en la línea HGUE-C-1

Tras haber cuantificado la expresión de proteína con el programa Image J, se procede a normalizar los valores de K-Ras con los de la  $\beta$ -actina. Si bien, solamente se representarán los valores de los extractos CR y NB, puesto que al observar el Western Blot del extracto PS, se puede deducir que las concentraciones a las que se ha probado éste, han causado una muerte celular mayor de lo esperado por el valor de  $IC_{50}$  obtenido, ya que no se observa banda en la membrana en la que se debería hallar K-Ras, y sí se observa banda en las calles de la condición control en la membrana de la  $\beta$ -actina. Además, se observa como los niveles de Beta-actina disminuyen al aumentar la concentración de extracto.

De esta manera, se obtienen los niveles de expresión de Ras para los extractos CR y NB con los que se trata la línea HGUE-C-1. El gráfico resultante se representa a continuación.

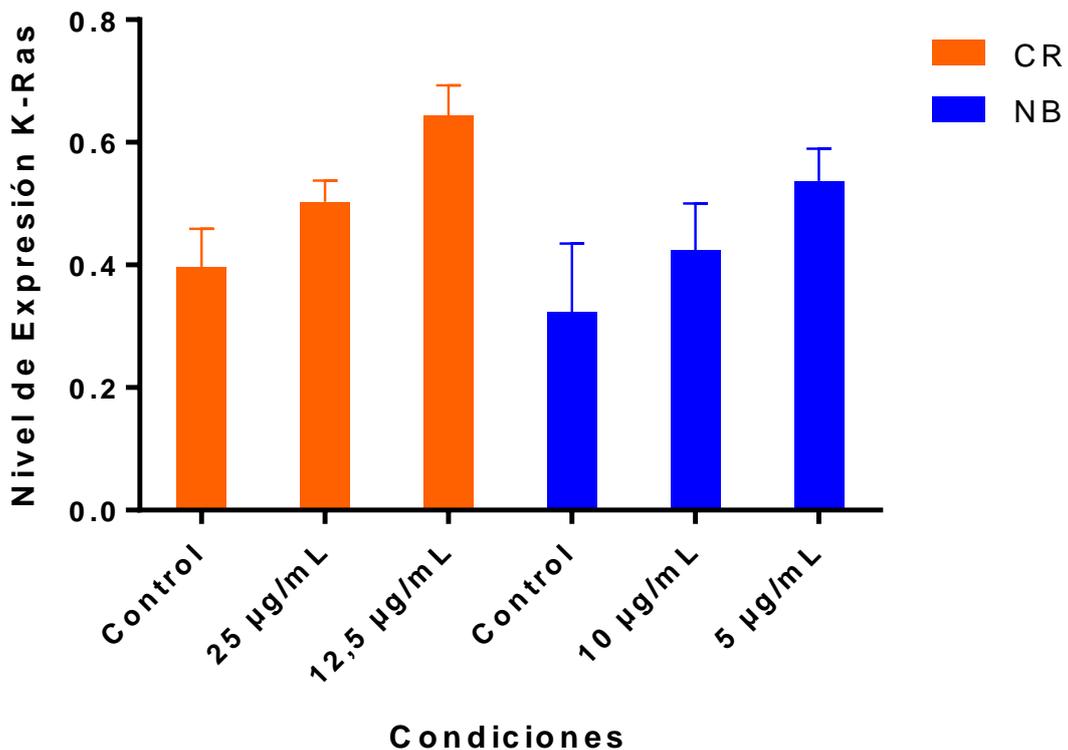


Figura 33.- Gráfico del nivel de expresión de K-Ras frente a condiciones de los extractos

#### 4.3.6 Análisis estadístico ANOVA two-way de la línea HGUE-C-1

Tras obtener los niveles de expresión de Ras para los extractos CR y NB en cada una de las condiciones determinadas, se procede a realizar un análisis estadístico ANOVA two-way.

El análisis se ha llevado a cabo para comprobar si existe significancia entre niveles de expresión de K-Ras dentro de cada uno de los extractos (CR y NB), y si existe significancia entre niveles de expresión de Ras entre extractos para cada condición.

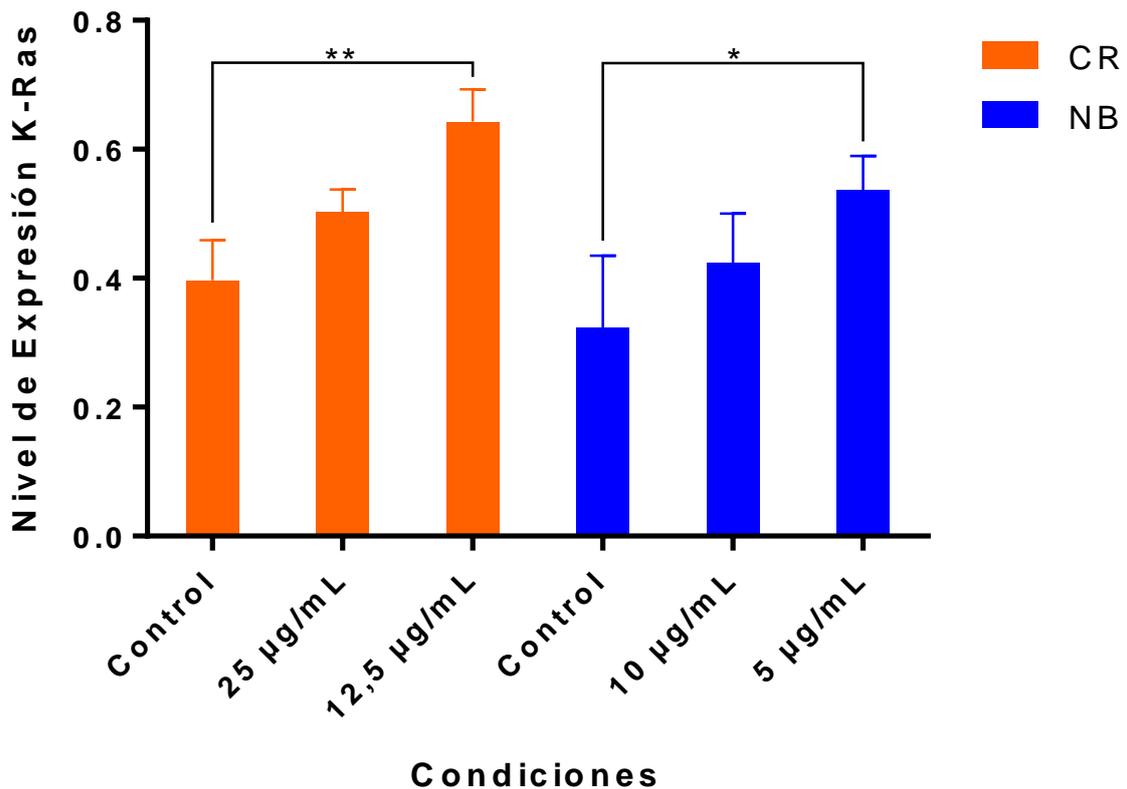


Figura 34.- Análisis estadístico ANOVA two-way: nivel de expresión de K-Ras frente a condiciones

Del gráfico anterior se puede obtener que los niveles de K-Ras en el control del extracto CR difieren significativamente de los de la concentración de 12,5 µg/mL del mismo extracto, con una significancia menor de 0,01 (\*\*,  $p < 0,01$ ). Además, se observa que los niveles de K-Ras en el control del extracto NB difieren significativamente de los de la concentración de 5 µg/mL del mismo extracto, con una significancia menor de 0,05 (\*,  $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos sobre la capacidad citotóxica de los extractos marinos testados en modelos celulares de cáncer de colon mutantes y no mutantes de K-Ras mediante la técnica MTT, se puede concluir que el extracto marino PS procedente de holoturia es el más efectivo en la mayoría de las líneas celulares analizadas, seguido del extracto NB (procedente de un nudibranquio), y finalmente del extracto CR (procedente de un coral blando).

Al llevar a cabo el análisis estadístico de los valores de  $IC_{50}$  obtenidos, se demuestra que los extractos PS y NB presentan una mayor capacidad antiproliferativa que el extracto CR, en las líneas celulares SW480, SW620 y HT-29. Aunque el análisis estadístico no demuestra diferencias significativas entre el extracto PS y el NB, el primero posee una capacidad antiproliferativa mayor que el segundo.

Por otro lado, el análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas en la capacidad antiproliferativa de los tres extractos (PS, NB y CR) en las líneas celulares HCT116 y HGUE-C-1. Si bien, esto puede ser debido a los errores obtenidos, y a que la  $n$  es 1 (aunque en cada uno de los MTT existan 6 réplicas). Por ello, se propone aumentar la  $n$ , como se detallará en el apartado de Proyección futura.

Por último, en el segundo análisis estadístico, que compara la capacidad de un mismo extracto para todas las líneas celulares, se demuestra que no existen diferencias significativas. Es decir, no hay ninguna línea de las cinco utilizadas que sea sustancialmente más resistente o más sensible a un mismo extracto.

Una vez determinadas las  $IC_{50}$  de cada uno de los 3 extractos en las 5 líneas celulares, se procedió a seleccionar una línea mutante de K-Ras (HCT116) y una no mutante de K-Ras (HGUE-C-1), con el objetivo de conocer si se pudiera modular el nivel de expresión de la proteína K-Ras en función de los extractos utilizados y de las líneas celulares tratadas. De esta manera, se definieron dos concentraciones a las que probar cada extracto marino. Además, hay que apuntar que el extracto CR se probó a concentraciones más altas que los extractos PS y NB debido a que es menos efectivo (posee una  $IC_{50}$  más alta).

Añadir que previamente se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se han analizado los niveles de ciertas proteínas implicadas en la ruta de señalización de Ras, como son MEK y ERK1/2 [24], en la línea celular HCT116 tras haberla tratado con distintos compuestos. No obstante, nuestro trabajo es el primero que mide los niveles de K-Ras en las líneas HCT116 y HGUE-C-1 al tratarlas con extractos marinos.

Así, en base a los resultados de expresión proteica obtenidos mediante la técnica Western Blot, se puede determinar que los tres extractos marinos probados (PS, CR y NB) ejercen efecto sobre la modulación de la expresión de la proteína de señalización intracelular K-Ras.

Más concretamente, cabe indicar que el extracto PS en la línea celular HCT116 parece aumentar los niveles de K-Ras en mayor medida que los extractos CR y NB. Se observan diferencias significativas entre los niveles de Ras para el control del extracto PS y los niveles de K-Ras para las dos concentraciones de dicho extracto ( $p < 0,001$  entre el control y la concentración de  $10 \mu\text{g/mL}$ , y  $p < 0,01$  entre el control y la concentración de  $5 \mu\text{g/mL}$ ).

Además, existen diferencias significativas entre los niveles de K-Ras con la concentración más baja de extracto PS y los niveles de K-Ras con las concentraciones más bajas de los extractos CR y NB; y al igual ocurre con la concentración más alta de extracto PS (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$  en todos estos casos). Si bien, no existen diferencias significativas entre los niveles de K-Ras para las concentraciones de extracto CR y los niveles de K-Ras para las concentraciones de extracto NB.

Por otro lado, sobre la línea celular HGUE-C-1 se puede argumentar que tras tratarla con los extractos CR y NB, los niveles de la proteína K-Ras aumentan con respecto al control. Pues existen diferencias significativas entre los niveles de K-Ras para el control y los niveles de K-Ras para la concentración más baja en ambos extractos ( $p < 0,01$  en CR, y  $p < 0,05$  en NB). No se observan diferencias significativas entre ambos extractos en dicha línea celular. Además, se observa que es necesario probar de nuevo el extracto PS en dicha línea celular pues, o bien las células no se comportaron correctamente, o bien se produjo un error de pipeteo, ya que la escasa señal obtenida denota una toxicidad mayor de la esperada según los valores de  $IC_{50}$  previamente obtenidos.

Por último, no se han observado diferencias significativas entre ambas líneas celulares para los extractos CR y NB y para la misma condición, tras realizar un análisis estadístico ANOVA two-way adicional. Por lo que se confirma el hecho de que ambos extractos modifican en la misma magnitud los niveles de expresión de K-Ras en ambas líneas celulares (HCT116 y HGUE-C-1).

Tras exponer los resultados obtenidos con sus análisis estadísticos, se pueden plantear dos posibles hipótesis: o bien las células reaccionan frente a los extractos aumentando los niveles de K-Ras, o bien los tratamientos pueden estar seleccionando las células que presenten más nivel de expresión de Ras en caso de que haya heterogeneidad en la línea. Pues un aumento de la expresión de Ras supone una mayor activación de las rutas Raf – MEK1/2 – ERK1/2 y PI3K – Akt – mTOR, dando lugar a un aumento de la proliferación celular [5].

Además, parece observarse una cierta relación dosis-respuesta entre los extractos probados y los niveles de expresión de K-Ras en las líneas celulares HCT116 y HGUE-C-1, que deberá definirse de una manera más profunda con ensayos futuros.

Por último, la relación entre la bioactividad de los tres extractos utilizados (PS, CR y NB) y su composición se establecerá cuando se consiga la caracterización cuantitativa de los mismos.

## **6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA**

### **6.1. Conclusiones**

En base a los resultados obtenidos y trabajos previos sobre la capacidad antiproliferativa de los extractos marinos testados en modelos celulares de cáncer de colon mutantes y no mutantes de Ras, junto con los objetivos determinados anteriormente, se pueden definir las siguientes conclusiones:

1. El extracto marino PS proveniente de holoturia presenta la mayor capacidad antiproliferativa de los tres extractos utilizados, seguido del extracto NB (nudibranquio), y finalmente del extracto CR (coral blando). Se observan diferencias significativas entre los extractos PS y NB con respecto al extracto CR en las líneas celulares SW480, SW620 y HT-29.
2. Los extractos PS, CR y NB no presentan una capacidad antiproliferativa distinta para líneas celulares mutantes y no mutantes de K-Ras.
3. Ninguna de las líneas celulares es sustancialmente más resistente o más susceptible a cada uno de los extractos marinos probados en el presente trabajo.
4. Los tres extractos marinos utilizados (PS, CR y NB) modulan los niveles de expresión de Ras en la línea celular HCT116 (mutante de K-Ras).
5. El extracto PS ejerce un aumento de los niveles de K-Ras muy superior al de los extractos CR y NB en la línea celular HCT116. Además, los extractos CR y NB ejercen un aumento en los niveles de K-Ras en la línea celular HGUE-C-1, y modifican en la misma magnitud los niveles de expresión de K-Ras en ambas líneas celulares (HCT116 y HGUE-C-1).

6. Existe una relación dosis-respuesta en los niveles de K-Ras con respecto a la concentración de los tres extractos (PS, CR y NB), en ambas líneas celulares (HCT116 y HGUE-C-1), a falta de concretar el efecto del extracto PS sobre la línea HGUE-C-1.

## **6.2. Proyección futura**

En el presente trabajo se han obtenido resultados concluyentes sobre la actividad citotóxica de los 3 extractos marinos testados, además de haber detectado una expresión diferencial de K-Ras para dos líneas celulares distintas tratadas con tales extractos.

Se propone para el futuro la repetición de los ensayos de viabilidad celular mediante MTT, con el objetivo de aumentar el número de repeticiones “n” hasta 3, permitiendo así un análisis estadístico más profundo.

También, se plantea el análisis de la expresión de la proteína K-Ras en las otras tres líneas celulares en las que no se ha llevado a cabo, tras tratarlas con los mismos tres extractos. Y, además, se analizará la expresión basal de dicha proteína K-Ras para las cinco líneas celulares utilizadas, sin tratarlas con ningún extracto; para, de esta forma, sacar una correlación de la actividad de los extractos frente a la expresión basal de K-Ras.

Por último, se persigue la continuación de esta línea de investigación, mediante la incorporación de más extractos marinos, y la selección de otras dianas moleculares distintas a K-Ras que también se encuentren relacionadas con la división y proliferación celulares, o la migración de las células e invasión a otros tejidos circundantes.

## 7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, he de agradecer al Grupo de Investigación de Compuestos Naturales Bioactivos del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, los conocimientos, el material y el apoyo que me ha brindado para haber hecho posible este presente trabajo. Además de abrirme las puertas del laboratorio para poder poner mi granito de arena en la búsqueda de terapias contra el cáncer.

Todos y cada uno de los integrantes de dicho grupo merecen mi reconocimiento: Vicente Micol Molina, Enrique Barrañón Catalán, María Dolores Herranz López, Almudena Pérez Sánchez, Verónica Ruiz Torres, María Losada Echeberría, Luz María Agulló Chazarra, Francisco Javier Álvarez Martínez, Gema Puebla Planas, Santiago Vidal García, Maite Garzón Cabrerizo y Jennifer Navarro. Pues ellos son, y serán, unos grandes investigadores.

Por supuesto, agradezco a toda mi familia el esfuerzo que hacen día a día por mí, para poder llegar a tener un futuro prometedor. Muchas gracias mamá (Cristina Gil Sánchez), papá (Rafael Ramón San José), tía (Eva María Gil Sánchez), tío (Francisco Suárez Socorro) y prima (Marina Suárez Gil), porque este trabajo no hubiera existido de no ser por haber podido llegar hasta aquí.

Gracias a todos aquellos amigos que siempre he tenido a mi lado; en el colegio, en el instituto y finalmente en la universidad.

Y muchas gracias a la Universidad Miguel Hernández de Elche, por haberme acogido desde el primer momento durante estos maravillosos cuatro años de mi vida.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. WHO, *Cancer Country Profiles*. 2014.
3. Pérez Sánchez, A., *Tesis doctoral: Actividad antitumoral de un extracto de romero (Rosmarinus officinalis L.) en modelos in vitro e in vivo de cáncer de colon*. 2017.
4. Xu, W., J. Trepel, and L. Neckers, *Ras, ROS and proteotoxic stress: a delicate balance*. Cancer Cell, 2011. **20**(3): p. 281-2.
5. Fremin, C. and S. Meloche, *From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy*. J Hematol Oncol, 2010. **3**: p. 8.
6. Kodaz, H., et al., *Frequency of Ras Mutations (Kras, Nras, Hras) in Human Solid Cancer*. EJMO, 2017. **1**(1): p. 1-7.
7. Fernandez-Medarde, A. and E. Santos, *Ras in cancer and developmental diseases*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 344-58.
8. Sanchez-Gundin, J., et al., *New Trends in the Therapeutic Approach to Metastatic Colorectal Cancer*. Int J Med Sci, 2018. **15**(7): p. 659-665.
9. Serna-Blasco, R., et al., *Targeting the RAS-dependent chemoresistance: The Warburg connection*. Semin Cancer Biol, 2018.
10. Ahmed, A.F., et al., *Anti-Inflammatory Lobane and Prenyleudesmane Diterpenoids from the Soft Coral Lobophytum varium*. Mar Drugs, 2017. **15**(10).
11. Martins, R.M., et al., *Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 412.
12. D'Incalci, M., et al., *Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment*. Br J Cancer, 2014. **111**(4): p. 646-50.
13. Mayer, A.M., et al., *The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(6): p. 255-65.
14. Lorente, A., et al., *Bioactive Marine Polyketides as Potential and Promising Drugs*. Vol. 1. 2014. 1003.
15. Negi, B., D. Kumar, and D.S. Rawat, *Marine Peptides as Anticancer Agents: A Remedy to Mankind by Nature*. Curr Protein Pept Sci, 2017. **18**(9): p. 885-904.
16. Petek, B.J. and R.L. Jones, *PM00104 (Zalypsis(R)): a marine derived alkylating agent*. Molecules, 2014. **19**(8): p. 12328-35.

17. Bhatnagar, I. and S.K. Kim, *Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies*. *Mar Drugs*, 2010. **8**(10): p. 2702-20.
18. Diaz, L., et al., *Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- $\kappa$ B-dependent mechanism*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12442.
19. Ruiz-Torres, V., et al., *An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs*. *Molecules*, 2017. **22**(7).
20. Borrás-Linares, I., et al., *Permeability Study of Polyphenols Derived from a Phenolic-Enriched Hibiscus sabdariffa Extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(8): p. 18396-411.
21. Gulfen, M., et al., *ESI-MS measurements for the equilibrium constants of copper(II)-insulin complexes*. *Int J Biol Macromol*, 2018. **112**: p. 188-196.
22. Borrás-Linares, I., et al., *A bioguided identification of the active compounds that contribute to the antiproliferative/cytotoxic effects of rosemary extract on colon cancer cells*. *Food Chem Toxicol*, 2015. **80**: p. 215-22.
23. Herranz-Lopez, M., et al., *Lemon verbena (Lippia citriodora) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms*. *Phytomedicine*, 2015. **22**(6): p. 605-14.
24. Merchant, M., et al., *Combined MEK and ERK inhibition overcomes therapy-mediated pathway reactivation in RAS mutant tumors*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0185862.